

L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GÈNES ASSOCIÉS À LA RESISTANCE AU NICKEL
CHEZ LE CHENE ROUGE (*QUERCUS RUBRA*) : EFFETS MOLÉCULAIRES DE LA
TOXICITÉ DE DIFFÉRENTES DOSES DE NITRATE DE NICKEL

par

Charnelle Linda Djeukam

Thèse présentée pour répondre
à l'une des exigences de la
maîtrise ès sciences (MSc) en biologie

Faculté des études supérieures
Université Laurentienne
Sudbury (Ontario) Canada

© Charnelle Linda Djeukam, 2018

THESIS DEFENCE COMMITTEE/COMITÉ DE SOUTENANCE DE THÈSE

Laurentian Université/Université Laurentienne
Faculty of Graduate Studies/Faculté des études supérieures

Title of Thesis
Titre de la thèse

L'ANALYSE DE L'EXPRESSION DE GÈNES ASSOCIÉS A LA RESISTANCE
AU NICKEL CHEZ LE CHENE ROUGE (QUERCUS RUBRA) : EFFETS
MOLÉCULAIRES DE LA TOXICITÉ DE DIFFÉRENTES DOSES DE NITRATE
DE NICKEL

Name of Candidate
Nom du candidat

Djeukam, Charnelle Linda

Degree
Diplôme

Maîtrise ès Sciences

Department/Program
Département/Programme

Biologie

Date of Defence

Date de la soutenance 9 janvier 2018

APPROVED/APPROUVÉ

Thesis Examiners/Examineurs de thèse:

Monsieur Kabwe Nkngolo
(Supervisor/Directeur de thèse)

Monsieur Abdelwahab Omri
(Committee member/Membre du comité)

Madame Melanie Mehes-Smith
(Committee member/Membre du comité)

Monsieur Benoit Bizimungu
(External Examiner/Examineur externe)

Approved for the Faculty of Graduate Studies
Approuvé pour la Faculté des études supérieures
Dr. David Lesbarrères
Monsieur David Lesbarrères
Dean, Faculty of Graduate Studies
Doyen, Faculté des études supérieures

CLAUSE D'ACCESSIBILITÉ ET PERMISSION D'UTILISER DES DOCUMENTS

Je, **Charnelle Linda Djeukam**, accorde à l'Université Laurentienne et à ses agents l'autorisation non exclusive d'archiver ma thèse ou mon rapport de projet et d'en permettre l'accès, en tout ou en partie et dans toute forme de média, maintenant ou pour la durée de mon droit de propriété du droit d'auteur. Je conserve tous les autres droits de propriété du droit d'auteur de la thèse ou du rapport de projet. Je me réserve également le droit d'utiliser dans de futurs travaux (comme des articles ou des livres) l'ensemble ou des parties de ma thèse ou de mon rapport de projet. J'accepte en outre que la permission de reproduire cette thèse de quelque manière que ce soit, en tout ou en partie à des fins savantes, soit accordée par le ou les membres du corps professoral qui ont supervisé mes travaux de thèse ou, en leur absence, par le directeur ou la directrice de l'unité dans lequel mes travaux de thèse ont été effectués. Il est entendu que toute reproduction ou publication ou utilisation de cette thèse ou de parties de celles-ci à des fins lucratives ne doit pas être autorisée sans ma permission écrite. Il est également entendu que cette copie est présentée sous cette forme par l'autorité du titulaire du droit d'auteur uniquement pour fins d'études et de recherches particulières et ne doit pas être copiée ou reproduite sauf en conformité avec la législation sur le droit d'auteur sans l'autorisation écrite du titulaire du droit d'auteur.

RESUME

Les objectifs principaux de cette étude étaient 1) de déterminer le niveau de toxicité du nickel chez le chêne rouge (*Quercus rubra*), 2) d'évaluer la régulation des gènes associés à la résistance au nickel chez les plantes de *Q. rubra* exposées à plusieurs doses de nickel et 3) de déterminer l'expression des gènes impliqués dans la résistance au nickel chez les populations de *Q. rubra* provenant de sites contaminés avec des métaux et de sites références de la Région du Grand Sudbury (RGS). Plusieurs gènes associés à la résistance au Ni dans des plantes modèles et non modèles ont été ciblés dans cette étude. Le PCR en temps réel (RT-qPCR) a été réalisé suivant le protocole du fabricant. Nous n'avons observé aucun dommage ni de ralentissement de croissance causés par le nickel sur les plantes qui ont été traitées avec différentes doses de nitrate de nickel. L'expression des gènes Sérine AcétylTransférase (SAT) et Nicotianamine Synthase (NAS 3) ont été induites par le nickel dans les feuilles des plantes traitées avec 1600 mg/kg comparées aux doses de 150 mg/kg et 800 mg/kg et les contrôles. Par contre, l'expression de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique désaminase (ACC désaminase) dans les feuilles a été induite par le nitrate plutôt que le Ni lorsque les plantes étaient traitées avec 800 mg/kg comparé aux témoins et autres doses. Aucune association n'a été établie entre l'expression de NAS 3, SAT, ACC désaminase, Glutathion Réductase (GR), la protéine macrophage associé à la résistance naturelle (NRAMP 3), la famille des protéines de transport à haute affinité (AT2G16800) et la contamination par les métaux dans les populations naturelles de *Q. rubra* dans la RGS. Ceci suggère que la quantité de métaux biodisponibles dans le sol n'est pas assez suffisante pour affecter l'expression des gènes.

Mots clés : Toxicité et résistance au nickel, contamination par des métaux, expression des gènes, région du Nord de l'Ontario, chêne rouge (*Quercus rubra*).

REMERCIEMENTS

Avant tout développement sur cette étude, il paraît opportun de commencer par des remerciements. Le fruit d'une œuvre bien élaborée est accordé à son concepteur mais, il n'en demeure pas moins vrai que celui-ci est en général le fruit d'une combinaison d'idées.

Je tiens tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux pour ses grâces et sa présence dans ma vie et pour m'avoir donné la force, le courage et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance à mon superviseur, Dr Kabwe Nkongolo, pour m'avoir donné l'occasion de travailler dans son laboratoire, pour ses précieux conseils, son accompagnement, son aide et son dévouement durant toute ma période d'étude.

Merci au Dr Abdel Omri et au Dre Mélanie Mehes-Smith, membres de mon comité de supervision, pour leurs conseils et leurs commentaires utiles pour la complétion de ce travail.

Merci au Dr Paul Michael, Dre Ramya Narendrula, Dr Gabriel Thériault, Kersey Kalubi et Sabrina Rainville pour leur aide, leurs conseils, leurs encouragements et leur assistance lors des travaux d'échantillonnage et de recherche.

Je ne saurais terminer sans remercier ma famille et mes amies pour leurs encouragements et le soutien inconditionnel. Un merci particulier à ma sœur Sandy et mon cher époux pour leur soutien sans faille et les conférences téléphoniques pour me tenir compagnie au laboratoire.

Clin d'œil à ma grand-mère qui veille sur moi de là-haut.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	xi
LISTE DES ANNEXES.....	xii
CHAPITRE 1 : REVUE LITTÉRAIRE.....	13
1.0. Contamination par les métaux dans la région du Grand Sudbury	13
1.1. Réclamation et remédiation des sols contaminés par les métaux	14
1.2. Analyse des métaux et du pH dans les sols	16
1.3. Espèce étudiée.....	16
1.3.1. Description	17
1.3.2. Distribution	17
1.3.3. Culture	18
1.3.4. Utilisations.....	18
1.4. La variabilité génétique des populations de <i>Q. rubra</i>	20
1.5. Mécanismes moléculaires de la toxicité et de la résistance au nickel	21
1.5.1. Fonctions du nickel chez les plantes	21
1.5.2. Absorption et transport du nickel par les plantes.....	21
1.5.3. Phytotoxicité du nickel.....	23
1.5.4. Mécanismes de toxicité du nickel chez les plantes.....	23
Interférence avec les ions métalliques essentiels	23
Induction du stress oxydatif	24
1.5.5. Mécanismes de résistance aux métaux chez les plantes	25
Stratégie d'évitement	25
Stratégie de tolérance	26

1.5.6.	Gènes impliqués dans la résistance au nickel chez les plantes	27
	Les chélateurs	27
	Les transporteurs	28
1.6.	Mesure du niveau d'expression de gènes chez les plantes	30
1.7.	Objectifs.....	33

CHAPITRE 2 : L'ANALYSE DE LA TOCIXITÉ DU NICKEL ET DE L'EXPRESSION DE GÈNES CHEZ DES GÉNOTYPES DE CHÈNE ROUGE (*Q. rubra*) TRAITÉS AVEC DIFFÉRENTES DOSES DE NITRATE DE NICKEL

2.0.	Introduction	34
2.1.	Matériel et méthode.....	35
	Chambre de croissance : traitement au nitrate de nickel.....	35
	Extraction de l'acide ribonucléique(ARN).....	36
	RT-qPCR.....	37
	Analyses statistiques.....	40
2.2.	Résultats.....	42
	Toxicité du nickel.....	42
	Expression génique	42
2.3.	Discussion	45
	Importance des traitements contrôles	45
	Toxicité du nickel.....	45
	Régulation des gènes	47
2.4.	Conclusion	51

CHAPITRE 3 : EXPRESSION DE GENES ASSOCIES A LA RESISTANCE AU NICKEL CHEZ LES POPULATIONS DE CHENE ROUGE (*QUERCUS RUBRA*) PROVENANT DES ZONES CONTAMINEES AVEC DES MÉTAUX DU NORD DE L'ONTARIO.....

3.0.	Introduction	66
3.1.	Matériel et méthode	67
	Echantillonnage	67
	Extraction de l'ARN.....	67

RT-qPCR	68
Analyses statistiques	68
3.2. Résultats.....	70
3.3. Discussion	70
3.4. Conclusion	72
CHAPITRE 4 : CONCLUSION GÉNÉRALE.....	76
Etudes futures.....	77
REFERENCES.....	78
ANNEXE	92

LISTE DES FIGURES

Figure 1.0 : Carte de l'Amérique du Nord illustrant la distribution du chêne rouge d'Amérique (<i>Quercus Rubra</i>).....	19
Figure 2.0. Zones de localisation des glands de <i>Q. rubra</i> en Ontario, Canada. Les glands utilisés pour cette expérience proviennent de la zone 34 du sud de l'Ontario.....	41
Figure 2.1. Produits d'amplification des amorces synthétisées pour les gènes ciblés (SAT, GR, NAS3, NRAMP3, ACC désaminase et AT2G16800) provenant du PCR de l'ADN de <i>Q. rubra</i>	56
Figure 2.2. Expression de ACC désaminase au niveau des feuilles de <i>Q. rubra</i> pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de ACC désaminase a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey ($P \geq 0.05$).....	58
Figure 2.3. Expression de ACC désaminase au niveau des racines de <i>Q. rubra</i> pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de ACC désaminase a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey ($P \geq 0.05$).....	59
Figure 2.4 Expression de l'ACC désaminase au niveau des feuilles et des racines de <i>Q. rubra</i> pour les traitements au nitrate de nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg. L'expression de ACC désaminase a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student ($P \leq 0.05$).....	60
Figure 2.5. Expression de la sérine acétyltransférase (SAT) au niveau des feuilles de <i>Q. rubra</i> pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement	

contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).....61

Figure 2.6. Expression de la sérine acétyltransférase (SAT) au niveau des racines de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).....62

Figure 2.7 Expression de la sérine acétyltransférase (SAT) au niveau des feuilles et des racines de *Q. rubra* pour les traitements au nitrate de nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées par le test t de Student ($P \leq 0.05$).....63

Figure 2.8. Expression de la Nicotianamine synthase 3 (NAS3) au niveau des feuilles de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de NAS3 a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).....64

Figure 2.9. Expression de la Nicotianamine synthase 3 (NAS3) au niveau des racines de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de NAS3 a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).....65

Figure 3.0. Localisation des sites d'échantillonnage de *Q. rubra* dans la région du Grand Sudbury au nord de l'Ontario. Site 1: Kelly Lake, site 2 : Laurentienne, site 3 : Killarney, site 4 : Capreol, site 5 : St-Charles et site 6 : Wahnapiatae Hydro Dam.....69

Figure 3.1 Expression de a) ACC désaminase, b) GR et c) SAT dans les racines des populations de *Q. rubra* provenant des zones de référence (Killarney, St-Charles et Capreol) et des zones contaminées (Wahnapiatae Hydro Dam, Laurentian et Kelly Lake,) de la région du Grand Sudbury. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne 18S ARNr, tandis que l'expression de GR et ACC désaminase a été normalisée par le gène EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey ($P \geq 0.05$).....73

Figure 3.2 Expression de a) NAS3, b) NRAMP 3 et c) AT2G16800 dans les racines des populations de *Q. rubra* provenant des zones de référence (Killarney, St-Charles et Capreol) et des zones contaminées (Wahnapiatae Hydro Dam, Laurentian et Kelly Lake,) de la région du Grand Sudbury. L'expression de ces gènes a été normalisée par le gène EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey ($P \geq 0.05$).....74

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.0. L'évaluation de dommages aux plantes selon une échelle d'évaluation de 1 (sans dommages) à 9 (plantes mortes) après traitements au nickel.....	53
Tableau 2.1. Gènes ciblés pour évaluer la résistance au nickel chez <i>Q. rubra</i>	54
Tableau 2.2. Séquence des amorces utilisées pour RT-qPCR, la taille du produit d'amplification attendue et obtenue et les températures d'hybridation de chaque gène.....	55
Tableau 2.3. Moyennes (\pm ES) des cotes de dommages et de la croissance absolue de <i>Q. rubra</i> suite aux différents traitements avec le nitrate de nickel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) et le nitrate de potassium (KNO_3) à la fin de la période expérimentale (14 jours).....	57

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : guide de la concentration des métaux dans le sol selon le ministère de l'environnement et de l'action en matière de changement climatique de l'Ontario.....	93
ANNEXE 2 : arbre, feuille et gland du chêne rouge d'Amérique (<i>Q. rubra</i>).....	94

CHAPITRE 1 : REVUE LITTÉRAIRE

1.0 Contamination par les métaux dans la région du Grand Sudbury

Les métaux lourds constituent de sérieux polluants environnementaux, notamment dans les zones à haute pression anthropique tels que les régions minières. Le nord de l'Ontario et plus particulièrement la Région du Grand Sudbury (RGS) où se trouve une des plus grandes opérations minières au monde est connue pour les dépôts métalliques tels que le cuivre et le nickel (Winterhalder, 1995 ; Adamo et *al.* 2002)

L'extraction, la torréfaction et la fusion de ces éléments dans les fonderies ont provoqué des effets désastreux sur la végétation et l'environnement global de cette région (Amiro et Courtin, 1981 ; Gratton et *al.* 2000 ; Nkongolo et *al.* 2008 ; Vandeligt et *al.* 2011 ; Narendrula et *al.* 2012). La libération de plus de 100 millions de tonnes de dioxyde de soufre et des dizaines de milliers de tonnes de cobalt, nickel, fer, et cuivre pendant de nombreuses décennies dans l'atmosphère de la RGS a eu un effet majeur sur l'environnement (Freedman et Hutchinson, 1980; Nkongolo et *al.*, 2008). Cette région est de ce fait passée de semi-aride à complètement stérile et plusieurs études ont identifié les émissions de dioxyde de soufre et des particules de métaux présents dans les sols et dans diverses espèces de plantes comme étant les principales causes de cette stérilité.

Les concentrations des métaux et plus particulièrement du nickel et du cuivre ont été jugées plus élevées dans les zones autour des fonderies comparativement aux autres régions (Amiro et Courtin, 1981, Narendrula et *al.* 2012 ; 2013 ; Tran et *al.* 2014). Bien que la quantité de métaux lourds soit élevée dans les sols de cette région, il est essentiel de prendre en considération le

niveau des métaux biodisponibles aux biota afin de prédire leur phytotoxicité (Violante et *al.*, 2010 ; Abedin et *al.*, 2012 ; Mehes-smith et *al.* 2013).

1.1 Réclamation et remédiation des sols contaminés par les métaux

La perte de végétation induite par des décennies d'activités minières a causé l'érosion des sols dans la région du Grand Sudbury. Une partie importante de la couche arable de ces sols a été enlevée entraînant des carences en calcium (Ca), magnésium (Mg), manganèse (Mn), azote (N) et en phosphore (P) (Winterhalder, 1996 ; Smith, 2008). Ces sols sont devenus acides avec un pH allant de 2,0 à 4,5 et la teneur en métaux a augmenté de manière significative dans les proximités des fonderies. Comme exemple, la teneur moyenne en Cu et Ni des horizons organiques dans les sites de référence se situait entre 15-40 mg / kg et 20-30 mg / kg respectivement, mais atteignait 9700 mg / kg et 6960 mg / kg pour le Cu et le Ni respectivement dans les sites entourant les fonderies (Hazlett et *al.* 1983 ; Winterhalder, 1996).

L'élévation de la teneur des métaux dans les sols peut présenter des risques pour la santé des humains et d'autres organismes vivants dans un écosystème. Il est nécessaire de développer des solutions efficaces, peu coûteuses et des méthodes durables de bioremédiation du sol afin de pallier à ce problème. La revégétation de ces sols semble être la méthode la plus appropriée pour la récupération des terres à long terme, car les plantes peuvent améliorer les conditions nutritives des sols et établir une couverture végétative suffisante pour empêcher l'érosion du sol (Wei et *al.* 2005 ; Mehes-Smith et *al.* 2013). La phytoremédiation est une approche peu coûteuse utilisée pour enlever, stabiliser et détoxifier les polluants organiques et inorganiques, y compris les métaux lourds provenant de l'air, du sol et des substrats liquides (Salt et *al.*, 1998). Les espèces végétales sélectionnées pour la remise en état des terres devraient croître et se propager

rapidement et être en mesure d'établir une couverture du sol efficace. Il est donc important de rechercher des plantes qui ont spontanément colonisé ces sites perturbés (Mehes-Smith et *al.*, 2013). Il a été démontré que les espèces annuelles ont une vaste capacité adaptative par rapport aux génotypes pérennes en raison de leur sélection naturelle à long terme (Wei et *al.*, 2005).

En 1969, le Programme d'amélioration de l'environnement de Sudbury (SEEP), qui comprenait le département des terres et forêts de l'Ontario et le département de biologie de l'Université Laurentienne avait débuté la réclamation en plantant plusieurs milliers d'arbres dans la RGS. Le taux de mortalité des arbres plantés dans les sols de Coniston était près de 100% alors que, dans la région de Skead, il y avait un taux de survie raisonnable malgré le taux de croissance limité. Des recherches menées par la suite ont montré que le niveau de pH combinés à des niveaux élevés de Cu et de Ni empêchaient la croissance optimale des arbres plantés (Hutchinson et Whitby, 1973 ; Makela, 2016). Il a également été montré que chauler les sols augmentait la germination des graines et la croissance des arbres plantés. Ce processus impliquait l'application de matériaux riches en Ca et Mg tels que la marne, la craie et le calcaire ou de la chaux hydratée pour neutraliser l'acidité du sol et augmenter l'activité des bactéries du sol (Winterhalder, 1996). Les projets de réclamation subséquents comprenaient non seulement la plantation d'arbres, mais aussi l'analyse du pH, le chaulage et la fertilisation de sites arides et semi-arides dans la RGS (Hutchinson et Whitby, 1973). Depuis 1978, plus de douze millions d'arbres et d'arbustes ont été plantés et plus de trois mille hectares de terres ont été chaulées, fertilisées etensemencées (VETAC 2015).

1.2 Analyse des métaux et du pH dans les sols

Plusieurs études ont été menées sur l'accumulation des métaux dans les sols de la RGS et sur leur effet sur la santé de l'écosystème (Hutchinson et Whitby, 1973 ; Nkongolo et *al.*, 2013, Winterhalder, 1996 ; Wren, 2012). Les concentrations actuelles de métaux dans les populations situées à proximité des fonderies de Sudbury dépassent toujours les limites acceptables établies par le ministère de l'Environnement et de l'action en matière de changement climatique de l'Ontario (annexe 1) (Nkongolo et *al.*, 2013 ; Wren 2012). Des différences significatives dans les concentrations moyennes d'aluminium total (Al), d'arsenic (As), de Cu et de Ni ont été observées dans les sols situés à moins de 15 kilomètres des fonderies de Sudbury par rapport aux populations de référence. La concentration moyenne des éléments biodisponibles a montré des différences significatives entre les populations contaminées et les populations de référence. Le pH du sol dans les populations de Sudbury varie de 2,35 à 6,7 et diminue à proximité des fonderies de Sudbury (Nkongolo et *al.*, 2013; Tran et *al.*, 2014). Les populations des zones chaulées ont des niveaux de pH allant de 4,12 à 6,7, ce qui est significativement plus élevé que les populations des zones qui ne sont pas chaulées (2,35 à 4,87) (Nkongolo et *al.*, 2013).

1.3 Espèce étudiée

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophyta

Classe : Dicotyledones

Ordre : Fagales

Famille : Fagaceae

Genre : *Quercus*

Espèce : *Quercus rubra*

1.3.1 Description

Les arbres feuillus de l'espèce *Quercus rubra* (syn. *Quercus borealis*) sont communément appelés chêne rouge d'Amérique ou simplement chêne rouge. Ils font partie de la famille des fagacées et du genre très complexe *Quercus*. Ce genre se dit complexe au niveau génétique et taxonomique en raison de l'existence de plusieurs variétés et de mauvaises barrières reproductives qui conduisent à des hybridations naturelles fréquentes (Dodd & Kashami 2003 ; Schnitzler et *al.*, 2004 ; carvalho et *al.*, 2009). Dans de nombreuses forêts, cet arbre a des feuilles caduques est monoïque et a une croissance rapide avec une hauteur moyenne de 20 à 30 m et un tronc de 50 à 100 cm de diamètre, les meilleurs sujets pouvant atteindre jusqu'à 50 m de hauteur. Sa longévité est d'environ 200 ans voire 500 ans dans des conditions optimales (Fowells, 1965). Son tronc est lisse avec une écorce extérieure gris foncée ou noire et une écorce intérieure rouge ou rose. Les feuilles de *Q. rubra* sont grandes, alternées et mesurent environ 10 à 25 cm de long et 8 à 15 cm de large avec 7 à 11 lobes anguleux à extrémité plus ou moins épineuse (Annexe 2) (Nexom 2003).

1.3.2 Distribution

Le genre *Quercus* couvre l'ensemble de l'hémisphère nord et colonise des habitats allant des forêts tropicales et tempérées aux zones semi désertiques et arbustives (Nixon 1993). L'espèce *Quercus rubra* est largement distribuée sur une grande partie de l'Est des États- unis et du Sud-est Canadien. Il croit du Québec, de l'Ontario, de Nova Scotia et du Nouveau –Brunswick vers le Sud-Ouest de la Géorgie, l'Alabama, le Nord du Mississippi, le Nord de l'Arkansas et l'Est de l'Oklahoma. Il s'étend vers l'ouest à travers le Minnesota et l'Iowa et vers le Sud-est à travers le

Nebraska et la Kansas (Figure 1.0). (Nexom 2003). En Ontario, il couvre l'Est du lac Supérieur, la rive Nord du lac Huron et les zones au Sud de Sudbury.

1.3.3 Culture

Q. rubra est une espèce à croissance rapide qui pousse aussi bien sur le terrain silicieux que venteux. Sa croissance est estimée à environ 1 m par an dans les conditions idéales durant les dix premières années. Il se développe sur les pentes mésiques et les hautes terres bien drainées, généralement orientées vers le nord ou l'est. Pour une croissance optimale, cette espèce doit être entièrement exposée au soleil et se développer dans un sol bien drainé, légèrement acide et sableux. Il produit des fruits appelés glands entre 20 -25 ans, bien que la plupart des arbres ne produisent des glands en abondance qu'entre 40 -50 ans. Les graines qui tombent sont particulièrement vulnérables à la prédation des rongeurs ainsi, la fréquence de germination est beaucoup plus élevée lorsqu'une couche de litières couvre les glands. Dans les conditions naturelles, la germination se produit au printemps après la période de dormance hivernale (Nesom, 2003).

1.3.4 Utilisations

Q. rubra est largement planté comme décoration en raison de sa forme symétrique et du feuillage très coloré durant l'automne (Burns & Honkala, 1990). Son bois est dur, lourd, solide et de couleur rose à brun rougeâtre. Ce dernier est utilisé pour la fabrication des planchers, des meubles, des traverses de chemin de fer, des ouvrages de menuiseries et des piquets de clôture. Le gland de *Q. rubra* est une source très importante de nourriture pour de nombreux mammifères et oiseaux tels que le chevreuil, l'ours, les dindons, les cailles, les mésanges, les écureuils et bien d'autres espèces fauniques.



http://www.efloras.org/object_page.aspx?object_id=6870&flora_id=1

Figure 1.0 : Carte de l'Amérique du Nord illustrant la distribution du chêne rouge d'Amérique (*Quercus rubra*).

1.4 La variabilité génétique des populations de *Q. rubra*

La variabilité génétique peut être définie comme les différences entre les individus d'une population au niveau génotypique (Freeman et Herron, 2014). Un haut degré de variabilité génétique présent dans une population est un indicateur d'adaptabilité et de survie dans diverses conditions environnementales. Cela permet à l'espèce de demeurer en santé, d'être durable et de maintenir une taille de population viable (Grant, 2010).

La compréhension du degré de variabilité génétique présent au sein et entre les populations est d'une grande importance écologique et économique (Conner et Hartl, 2004). La variation génétique au sein d'une population est souvent causée par des mutations, la recombinaison, la migration, la sélection naturelle ou un changement génétique aléatoire. Cependant, il existe aussi des preuves solides sur le fait que les variations génétiques peuvent également se produire très rapidement chez les plantes en réponse à des activités anthropogéniques telles que l'augmentation des métaux (Nordal et *al.*, 1999), des herbicides (Heap, 1997), la pollution par l'ozone (Davidson & Reiling, 1995), l'augmentation du dioxyde de carbone atmosphérique et le déboisement (Ward et *al.*, 2000 ; Law & Salick, 2005).

La variation génétique a fait l'objet de multiples études durant cette décennie. Des réductions de la variabilité génétique en réponse à la contamination par les métaux chez *Deschampsia cespitosa* et *Armeria maritima* ont été signalées (Vekemans et *al.*, 1996 ; Mehes-Smith & Nkongolo, 2015). Des études récentes utilisant des marqueurs ISSR pour analyser la variation génétique chez des espèces de feuillus telles que *Betula papyrifera* et *Q. rubra* ont révélé des niveaux modérés à élevés de variation dans les populations contaminées par des métaux et les populations de référence de la région du Grand Sudbury (Nkongolo et *al.*, 2013 ; Theriault et *al.*, 2014 ; Tran et *al.*, 2014).

1.5 Mécanismes moléculaires de la toxicité et de la résistance au nickel

1.5.1 Fonctions du Nickel chez les plantes

Le nickel est un microélément essentiel pour la croissance des plantes. Bien que sa concentration dans la majorité des espèces de plantes reste très faible (0.05 à 10 mg/kg de masse sèche), il joue un rôle important dans la physiologie végétale (Nieminen et *al.*, 2007). Il a été identifié comme centre actif de l'uréase, une enzyme largement distribuée dans les plantes supérieures et ayant une fonction de catalyse et d'hydrolyse de l'urée. Par conséquent, l'uréase pourrait empêcher l'accumulation d'urée qui est générée pendant les processus métaboliques et qui est toxique pour les plantes lorsque présente à des concentrations élevées (Dixon et *al.*, 1975). Le Ni a également été identifié comme composant de plusieurs enzymes tels que la famille I des glyoxalases, les peptides déformylases, la méthyl-CoM réductase et quelques superoxyde dismutases et hydrogénases. Par conséquent, ce métal joue un rôle important dans divers processus métaboliques importants notamment l'uréolyse, le métabolisme de l'hydrogène et la méthanisation biogénique (Chen et *al.*, 2009).

Sur le plan biologique, le Ni a des fonctions dans la production des graines, la croissance des plantes, l'absorption du fer et le métabolisme de l'azote (Brown et *al.*, 1987). Etant donné que le nickel est essentiel pour le métabolisme végétal, son absorption et son transport dans les plantes facilitent son implication dans certains processus physiologiques importants.

1.5.2 Absorption et transport du nickel par les plantes

L'absorption globale du Ni par les plantes dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels, la concentration du Ni ²⁺ ; le métabolisme des plantes, l'acidité du sol, la présence d'autres métaux, la composition du sol en matières organiques et les propriétés géochimiques du sol (Chen et *al.*,

2009). Cette absorption se fait principalement à travers le système racinaire via la diffusion passive et le transport actif (Seregin & Kozhevnikova, 2006). Le ratio d'absorption entre ces deux types de transport varie selon les espèces de plantes, la forme du Ni et sa concentration dans le sol. En effet, les composés de Ni solubles peuvent être absorbés par le système de transport des cations. Par exemple, le Cu^{2+} et le Zn^{2+} inhibent l'absorption de Ni^{2+} de manière compétitive et ces trois ions métalliques solubles semblent être absorbés par le même système de transport. Le transport actif secondaire du Ni^{2+} chélaté est possible grâce aux protéines qui lient spécifiquement le Ni^{2+} tel que HoxN (protéine de transport de Ni à haute affinité, une perméase), les metallothionéines (MT), et métallochaperones (Chen et *al.*, 2009).

Le transport du Ni se fait des racines vers les tiges (Peralta-Videa et *al.*, 2002) et feuilles (Krupa et *al.*, 1993) à travers le flux de transpiration du xylème. Cet élément est fourni aux parties méristématiques des plantes par retranslocation des feuilles âgées aux jeunes feuilles et aux bourgeons, fruits et graines via le phloème (McIlveen et *al.*, 1994 ; Fismes et *al.*, 2005 ; Page et *al.*, 2006). Ce transport est étroitement réglementé par les protéines qui lient spécifiquement le Ni et les ligands métalliques tels que la nicotianamine (NA), l'histidine (His) et les acides organiques (acide citrique et ions malate). Ces ligands métalliques peuvent agir comme chélateurs intracellulaires qui lient le Ni dans le cytosol ou dans les compartiments subcellulaires pour le transport, la translocation, et l'accumulation dans les plantes. (Krämer et *al.*, 2000 ; Kerkeb & Krämer, 2003 ; Douchkov et *al.*, 2005). Il a été rapporté que plus de 50 % du Ni absorbé par les plantes est retenu dans les racines (Seregin & Kozhevnikova 2006). Ceci peut être dû à la séquestration dans les sites d'échange de cations au niveau des parois cellulaires et à l'immobilisation dans les vacuoles des racines (Cataldo et *al.*, 1978).

1.5.3 Phyto-toxicité du nickel

Bien que le Ni soit essentiel pour plusieurs processus métaboliques chez les plantes, il est extrêmement toxique lorsque présent à des niveaux excessifs dans le sol ou dans les solutions nutritives auxquelles sont exposées ces plantes. Les signes généraux associés à la toxicité du Ni chez les plantes comprennent la réduction de la croissance des racines et des tiges, la diminution de la production de biomasse (Rahman et *al.*, 2005), le mauvais développement du système de ramification (Reeves et al. 1996), la déformation de diverses parties de la plante (Wright & Welbourn, 2002), les perturbations mitotiques dans les cellules racinaires (McIlveen & Negusanti, 1994), l'inhibition de la germination et la carence en Fe conduisant à la chlorose et la nécrose foliaire (Aggarwal et *al.*, 1990 ; Nedhi et *al.*, 1990 ; Ewais, 1997 ; Kukkola et *al.*, 2000 ; Kirkby & Romheld, 2004). Les niveaux excessifs de Ni affectent également l'absorption des nutriments par les racines, nuisent au métabolisme végétal et inhibent la photosynthèse et la transpiration (Sheoran et *al.*, 1990 ; Pandey & sharma, 2002 ; Hasinur et *al.*, 2005).

1.5.4 Mécanismes de toxicité du nickel chez les plantes

Bien que la toxicité du Ni ait été largement rapportée, les mécanismes détaillés sont encore mal compris. Etant donné que le nickel n'est pas un métal actif ou oxydo-réducteur (redox), sa toxicité est susceptible d'être causée par les mécanismes indirects tels que l'interférence avec d'autres ions métalliques essentiels et l'induction du stress oxydatif.

- *Interférence avec les ions métalliques essentiels*

Les études ont montré que les métaux tels que K, Ca, Na, Fe, Cu, Mn, Zn et Mg sont essentiels pour les plantes tout comme le Ni (Chen et *al.*, 2009). Le Ni a quelques caractéristiques similaires au Mg, Ca, Mn, Cu, Zn et Fe. Par conséquent, il peut rivaliser avec ces métaux dans

les processus de transpiration et d'absorption (Caltado et *al.*, 1978 ; Heale & Ormrod 1982 ; Körner et *al.*, 1987 Küpper et *al.*, 1996 ; Marschner, 2011). En raison de la concurrence, les concentrations élevées de Ni peuvent inhiber l'absorption de ces métaux, diminuer leur concentration et même conduire à leur carence chez les plantes (Gabbrielli et *al.*, 1990 ; Ahmad et *al.*, 2007) par la suite. Ceci peut affecter les processus physiologiques importants et finalement entraîner des effets toxiques. De nombreuses enzymes, telles que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), sont des métalloenzymes contenant du Fe, Cu, Zn ou Mn dans leurs groupes prosthétiques. Comme Pandey & Sharma (2002) ont montré que l'excès de Ni diminue les teneurs en Fe, Cu et Zn dans les tissus végétaux, il peut être spéculé que le Ni peut réduire la biosynthèse de ces métalloenzymes en provoquant des déficiences de ces métaux essentiels (Parida et *al.*, 2003 ; Gajewska et *al.*, 2006).

- *Induction du stress oxydatif*

Des études faites au fil des années suggèrent que la toxicité du Ni dans les plantes est également associée au stress oxydatif (Rao & Sresty, 2000 ; Boominathan & Doran, 2002 ; Gajewska et *al.*, 2006). Un excès de Ni entraîne une augmentation significative des radicaux hydroxyles, anions superoxydes, oxyde nitrique et peroxyde d'hydrogène (Boominathan & Doran 2002). Étant donné que le nickel n'est pas un métal redox-actif, il ne peut activer directement ces espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cependant, il interfère indirectement avec un certain nombre d'enzymes antioxydants tels que la glutathion peroxydase (GSH-Px), la glutathion réductase (GR), peroxydase (POD), la guaiacol peroxydase (GOPX), la catalase (CAT) et l'ascorbate peroxydase (APX). Gomes-Junior et *al.* (2006) ont prouvé que l'exposition des plantes à de faibles concentrations de Ni pour de courtes durées, augmente l'activité de GR, GOPX, POD et superoxyde dismutase (SOD) ce qui conduit donc à l'élimination des radicaux

libres. Cependant, l'excès de Ni réduit l'activité de nombreux enzymes antioxydants conduisant à l'accumulation des ROS et par conséquent au stress oxydatif chez les plantes (Gajewska & Skłodowska, 2007 ; Zhao et *al.*, 2008).

1.5.5 Mécanismes de résistance aux métaux chez les plantes

Le terme résistance fait référence à la réaction qui permet aux plantes de survivre face au stress métallique et d'assurer leur descendance (Levitt, 1980). Deux stratégies principales sont impliquées dans le phénomène de résistance : la stratégie d'évitement et la stratégie de tolérance (Mehes-Smith et *al.*, 2013).

- Stratégie d'évitement

Ceci est le mécanisme par lequel les plantes se protègent du stress métallique en limitant l'absorption des métaux au niveau du système racinaire (Brunet, 2008). Cette stratégie peut impliquer la formation d'une symbiose entre le système racinaire de la plante et les champignons mycorhizes. Ces derniers réduisent la quantité bio disponible des métaux dans la rhizosphère en les accumulant ou en sécrétant les composés chélatant dans leur environ (Ernst, 2006 ; Mehes-Smith et *al.* 2013 ; Emamverdian et *al.* 2015). Les plantes peuvent également restreindre l'absorption des métaux en les immobilisant grâce aux exsudats racinaires dans la rhizosphère. Ces molécules sécrétées sont généralement chargées négativement et ont une forte affinité pour les cations métalliques divalents tels que Ni^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} pour ne citer que ceux-ci (Brunet, 2008). Mganga et *al.* (2011) ont également montré que la paroi cellulaire est impliquée dans la restriction de l'absorption des métaux dans le cytoplasme de la cellule.

- *Stratégie de tolérance*

Cette stratégie fait référence aux réactions permettant de limiter les effets néfastes des métaux dans l'organisme. Il existe trois types de plantes utilisant les mécanismes de tolérance aux métaux, les excluants (excluders), les hyper accumulateurs et les indicateurs. Ces groupes diffèrent selon la quantité de métaux accumulés dans la plante et le type de tissus dans lequel ces derniers sont stockés.

Les excluants (excluders) accumulent les métaux au niveau de leurs racines pour éviter une absorption excessive en faisant le maintien de concentrations en métal dans les parties aériennes constantes et relativement faibles sur une large gamme de concentration dans le sol. Cette stratégie correspond à une forte réduction du transport des métaux vers les parties aériennes (translocation) et à une détoxification et une séquestration dans les tissus racinaires (Kumar et *al.* 1995).

Les espèces qui sont accumulatrices ou hyper accumulatrices ont des concentrations en métaux dans les parties aériennes supérieures aux valeurs normales de concentrations rencontrées chez les espèces végétales (Baker & Proctor, 1990). Ces espèces se caractérisent par des concentrations fortes en métaux dans les tissus aériens et font un important transport actif des métaux depuis les racines, où sont absorbés les métaux du sol, vers les organes chlorophylliens, qui sont les organes de détoxification et de stockage (Baker, 1981 ; Taylor, 1987).

Tout comme les hyper accumulateurs, les indicateurs accumulent les métaux dans les parties aériennes. Cependant, la concentration de métaux au niveau des tissus des plantes est similaire à celle trouvée dans le sol (Baker & Walker, 1989). Les indicateurs sont des marqueurs importants de la pollution puisqu'ils ne survivront pas s'ils continuent d'absorber les métaux (Mehes-Smith et *al.* 2013)

1.5.6 Gènes impliqués dans la résistance au nickel chez les plantes

Les gènes résistants au nickel codent pour des protéines qui jouent un rôle direct dans la détoxification des métaux ou des espèces réactives de l'oxygène qu'ils produisent. La majorité des gènes de résistance aux métaux peuvent être classés en deux catégories distinctes ; les chélateurs et les transporteurs de métaux.

- *Les chélateurs*

Les chélateurs sont des molécules qui séquestrent les métaux afin de les rendre inactifs. Ce sont généralement de petites molécules à faible teneur en carbone qui n'utilisent pas beaucoup d'énergie chez la plante pour leur production. De nombreux chélateurs sont des sous-produits du cycle de Krebs ou d'autres voies métaboliques. Par exemple, des niveaux cytosoliques élevés de nicotianamine, citrate, malate, et des acides aminés tels que la proline, l'histidine et le glutathion ont été rapportés comme jouant un rôle dans la résistance des métaux chez les plantes (Krämer et al. 1996 ; Freeman et al., 2004 ; Mari et al. 2006 ; Sharma & Dietz, 2009 ; Ryan et al. 2009 ; Liu et al. 2009). De nombreux hyperaccumulateurs dépendent des substrats chélatants pour un bon stockage des métaux. C'est le cas de l'hyperaccumulateur de nickel *Sebertia acuminata*, où le nickel n'est accumulé dans les tissus aériens que lorsqu'il est lié au citrate (Lee et al., 1977). Les gènes impliqués dans la production de ces métabolites sont souvent surexprimés dans les plantes résistantes aux métaux. Des taux élevés de glutathion et d'o-acétyl-sérine (OAS) ont été retrouvés au niveau des tiges de l'hyperaccumulateur de nickel *Thlaspi spp* (Freeman et al. 2004). Ces derniers ont également démontré que des taux élevés de ces métabolites sont associés avec des niveaux élevés d'expression de la sérine acétyltransférase (SAT) et de la glutathion réductase (GR). Ces enzymes jouent un rôle important dans la production et le renouvellement du glutathion (GSH). Une activité élevée de SAT est impliquée dans la résistance au Ni chez *T.*

goesingense qui est un hyperaccumulateur de Ni. Cette enzyme catalyse la réaction d'acétylation de la L-sérine pour produire l'O-acétyl-L-sérine, un régulateur positif de l'assimilation du soufre et un intermédiaire dans la biosynthèse de l'acide aminé cystéine. Une expression élevée de SAT chez *T. goesingense* a été associée à la capacité de cette espèce à hyperaccumuler le Ni et à résister aux effets oxydatifs néfastes de ce dernier (Freeman et *al.*, 2004). Il a également été démontré que des niveaux accrus de Ni dans les plantes provoquent une surexpression de GR impliquée dans le maintien de niveaux élevés de GSH. L'augmentation du GSH entraîne une augmentation de la résistance aux effets inhibiteurs de la croissance et au stress oxydatif du Ni (Freeman et *al.* 2004). Des niveaux élevés de Mg, Fe, Cu, Ni, et Zn ont été associés avec une augmentation du niveau d'expression de la nicotianamine synthase (NAS) (Kim et *al.* 2005 ; van de Mortel et *al.* 2006). La NAS est une enzyme qui joue un rôle dans la synthèse de la Nicotianamine (NA) par la trimérisation de la s-adénosylméthionine (Shojima et *al.*, 1990). Des études ont révélé que l'exposition au Ni déclenche l'accumulation de chélates NA-Ni en fonction de la dose de Ni dans le xylème chez *T. caerulescens* qui est aussi un hyperaccumulateur de Ni. Une fois dans les racines, le NA lié au Ni est redirigé vers les parties aériennes suivant le mode de transport racine-tige (Mari et *al.* 2006).

- *Les transporteurs*

La deuxième classe de gènes résistants aux métaux code pour de grandes protéines appelées transporteurs. Ces transporteurs sont impliqués dans la distribution des métaux dans différentes zones de la plante. Ils sont responsables de la compartimentation des métaux dans les tissus spécifiques chez les hyperaccumulateurs, les indicateurs et les excluants. La grande vacuole (entourée d'un tonoplaste) est souvent utilisée pour stocker des métaux et une fois à l'intérieur de la vacuole, les effets toxiques des métaux sur les organites sensibles sont réduits (Tong et *al.*,

2004 ; Yadav, 2010). Pour avoir une fonction optimale, les transporteurs de métaux dépendent souvent des chaperons métalliques ou d'autres ions (Hall, 2002). Certains transporteurs de métaux qui ont été décrits comme jouant un rôle dans la résistance des métaux sont NRAMP (protéine macrophage associées à la résistance naturelle), ABC (ATP-binding cassette), AT2G16800 (famille des protéines de transports à haute affinité), IREG (famille des protéines régulés par le fer), CDF (facilitateur de diffusion de cation) et la famille ZIP (ZRT, protéine IRT). Ces protéines sont responsables du maintien de l'homéostasie des métaux chez les animaux, les bactéries, et les plantes (Viehweger, 2014). Nombreux de ces transporteurs sont non spécifiques et peuvent transporter des classes de métaux ayant des propriétés physiques similaires. La famille des protéines macrophages associées à la résistance naturelle (NRAMP) est une famille de transporteurs d'ions métalliques, qui font partie intégrante de la membrane cellulaire. Cette protéine transporte les métaux tels que Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} et Zn^{2+} (Williams et *al.*, 2000). Mizuno et *al.* (2005) ont également prouvé que le NRAMP joue un rôle dans le transport et l'homéostasie du Ni^{2+} . La protéine de la famille des transporteurs à haute affinité AT2G16800 se lie au Ni et participe au transport de celui-ci à travers la membrane plasmique chez l'espèce *Arabidopsis thaliana* (Stearns et *al.*, 2005). Les gènes de la famille des protéines régulées par le fer (IREG) codent les transporteurs de Fe, mais des études faites ont découvert qu'IREG a une faible spécificité au Fe. Ainsi, en cas de déficience en Fe, l'accumulation d'autres métaux de transition incluant le Ni se produit et le métal est ensuite transporté dans la vacuole. Il a été démontré que cette famille est impliquée dans le transport des métaux de transition à partir de longues distances chez l'espèce *A. thaliana* (Schaaf et *al.* 2006). Toutefois, certains gènes ne se trouvent pas dans ces deux groupes c'est le cas de l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxilique (ACC) qui est une enzyme présente chez les bactéries

favorisant la croissance des plantes et est le précurseur biosynthétique de l'hormone végétale éthylène. Il a été démontré que l'ACC désaminase réduit les concentrations d'éthylène dans les plantes et diminue les effets négatifs de divers facteurs de stress environnementaux, y compris la toxicité du Ni, et contribue de ce fait à l'augmentation de la tolérance au nickel chez le canola (Stearns et *al.* 2005).

1.6 Mesure du niveau d'expression de gènes chez les plantes

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour analyser les niveaux d'expression des gènes chez les plantes. L'analyse de l'expression génique ciblée peut être effectuée si l'approche expérimentale est limitée à des gènes spécifiques ou à des zones spécifiques du transcriptome. Cependant, le séquençage du transcriptome entier est devenu de plus en plus courant et peut être mené chez des espèces ayant des séquences de transcriptome connues. Les applications courantes d'expression génique comprennent l'hybridation par transfert Northern Blot, l'hybridation in-situ et la réaction en chaîne de polymérase après transcription inverse (RT-qPCR) (Kramer, 2005). Il existe également des techniques supérieures telles que les puces à ADN et le séquençage de l'ARN (ARN-seq). Le choix de la technique dépend de plusieurs facteurs tels que la disponibilité de tissus frais, ainsi que le niveau d'expression attendu et le profil du gène candidat en question. Bien que les protocoles de ces procédures soient assez standards, une optimisation est souvent nécessaire en raison des caractéristiques spécifiques des espèces analysées (Kramer, 2005).

Le transfert « Northern », ou ARN blot est une technique utilisée dans la recherche en biologie moléculaire pour étudier l'expression des gènes par la détection de l'ARN (ou ARN messenger isolé) dans un échantillon. Afin de mener cette procédure, les cellules sont d'abord exposées à

une enzyme (protéase) qui décompose les membranes cellulaires et libère du matériel génétique. L'ARNm est ensuite extrait des autres composantes cellulaires et l'électrophorèse sur gel est utilisée pour séparer différents fragments d'ARNm. L'ARNm est ensuite placé sur un filtre ou un autre support en utilisant une technique appelée buvardage sous vide ou par capillarité. Afin d'identifier le gène, l'ARNm est incubé avec une sonde (morceau court d'ADN simple brin complémentaire ou ARN marqué avec une molécule radioactive). Le filtre est finalement placé contre un film radiographique pour exposer la sonde et l'intensité varie en fonction du niveau d'expression du gène. (Krumlauf, 1994).

L'hybridation *in situ* est une technique cytochimique permettant de localiser des séquences spécifiques d'ADN ou d'ARN dans un tissu ou un organisme (*in situ*). Les applications de la technologie d'hybridation *in situ* sont diverses (Jiang & Gill, 1993). Les sondes peuvent être synthétisées avec les nucléotides radioactifs ou des nucléotides non radioactifs. L'utilisation des nucléotides non radioactifs a considérablement amélioré l'hybridation *in situ* en diminuant le temps de développement et en donnant une excellente résolution histologique (Braissant & Wahli, 1998). L'utilisation la plus courante dans la biologie des cellules végétales est la localisation d'un ARN messager (ARNm) au niveau de la microscopie optique (McFadden, 1995).

La réaction en chaîne de polymérase après transcription inverse (RT-qPCR) est une technique qui permet de faire un PCR à partir d'un échantillon d'ARN. Ce dernier est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Cet ADNc est ensuite utilisé pour réaliser un PCR. La RT-qPCR permet de quantifier un type d'ARN initialement présent dans un échantillon. Elle peut se faire dans un appareil particulier qui permet de visionner en temps réel la synthèse des fragments

d'ADN. Pour cela, des molécules fluorescentes qui se fixent sur l'ADN sont utilisées. La fluorescence de l'échantillon augmente proportionnellement au nombre de molécules d'ADN. Cette technique est par exemple utilisée pour connaître le niveau d'expression d'un gène dans une condition donnée. Plus un gène est exprimé, plus le nombre de molécules d'ARN synthétisées sera grand. Grâce à la qRT-PCR, les chercheurs peuvent donc comparer le niveau d'expression d'un gène donné dans deux conditions différentes (Heid et *al.*, 1996 ; Mestdagh et *al.*, 2009 ; Derveaux et *al.*, 2010 ; Chen et *al.*, 2011).

Les puces à ADN sont souvent appliquées à des études d'expression génique à grande échelle. Initialement, ces puces ont été développées pour étudier l'expression des gènes dans les populations d'ARN, mais récemment les protocoles ont été modifiés pour analyser l'expression au niveau de l'ADN et de la protéine (Russo et *al.*, 2003). Les technologies de puces à ADN utilisent un support solide imperméable tel que du verre, des puces de silicium ou une membrane de nylon contenant des milliers de taches représentant chacune un gène. La technologie des puces à ADN nécessite l'hybridation entre des cibles libres marquées dérivées d'un échantillon biologique et un réseau de nombreuses sondes d'ADN immobilisées sur une matrice (Southern et *al.*, 1999 ; Babu, 2004)

Le RNA-seq est une technologie qui utilise le séquençage de nouvelle génération (next-generation sequencing) pour identifier et quantifier toutes les séquences d'ARN présents dans un échantillon à haute résolution. Cette identification des séquences d'ARN facilite la compréhension des mécanismes d'épissage alternatif de gènes comprenant les modifications post-transcriptionnelles, les polymorphismes nucléotidiques, et les changements dans l'expression génique. Les techniques de séquençage nouvelle génération ont permis la lecture de l'ADN d'une cellule, base par base (Wang et *al.*, 2009 ; Reis-Filho, 2009).

1.7 Objectifs

Les objectifs principaux de cette étude étaient 1) de déterminer le niveau de toxicité du nickel chez le chêne rouge (*Quercus rubra*), 2) d'évaluer la régulation des gènes associés à la résistance au nickel chez les plantes de *Q. rubra* exposées à plusieurs doses de nickel et 3) de déterminer l'expression des gènes impliqués dans la résistance au nickel chez les populations de *Q. rubra* provenant de sites contaminés par des métaux et de sites références de la région du Grand Sudbury.

CHAPITRE 2 : L'ANALYSE DE LA TOXICITÉ DU NICKEL ET DE L'EXPRESSION DE GÈNES CHEZ DES GÉNOTYPES DE CHÈNE ROUGE (*QUERCUS RUBRA*) TRAITÉS AVEC DIFFÉRENTES DOSES DE NITRATE DE NICKEL.

2.0 Introduction

Les plantes ont développé une variété de mécanismes leur permettant de croître en présence de métaux lourds toxiques tels que le cuivre, le zinc, le cadmium et le nickel (Howarth et *al.*, 2003). Ces mécanismes comprennent l'absorption et le transport d'ions métalliques et la détoxification par séquestration dans les vacuoles (Zenk, 1996 ; Küpper et *al.*, 1999). La Perturbation du métabolisme végétal par des métaux toxiques est empêchée par les protéines de chélation tels que la sérine acétyltransférase (SAT), la nicotianamine synthase (NAS) et l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique désaminase (ACC désaminase). Certaines protéines transporteurs de métaux sont également impliquées dans cette régulation du métabolisme des plantes en faisant un transport spécifique ou non des ions métalliques. Ces protéines sont responsables du maintien de l'homéostasie des métaux chez les animaux, les bactéries et les plantes (Viehweger, 2014). Le nickel est un microélément essentiel pour la croissance des plantes et il joue un rôle important dans la physiologie végétale (Nieminen et *al.*, 2007). A des concentrations élevées, cet élément peut devenir extrêmement toxique et entraver les mécanismes physiologiques des plantes.

La région du Grand Sudbury au Nord de l'Ontario a été pendant longtemps exposée aux dépôts de métaux tels que le nickel et les plantes s'y trouvant tels que *Q. rubra* ont développé des mécanismes de résistance pour contrer les effets néfastes de ces métaux sur la physiologie végétale. Cependant, les études sur le mécanisme de résistance génétique de cette espèce sont manquantes. Les objectifs spécifiques de cette étude sont donc 1) déterminer le niveau de toxicité du nickel chez le chêne rouge (*Quercus rubra*) et 2) d'évaluer la régulation des gènes

associés à la résistance au nickel chez les plantes de *Q. rubra* exposées à plusieurs doses de nickel.

2.1 Matériel et méthode

- *Chambre de croissance : traitement au Nitrate de nickel*

Des glands (seedlot # 007228) de chêne rouge (*Q. rubra*) provenant de la zone 34 du sud de l'Ontario, Canada (figure 2.0) ont été placés sur des papiers filtres mouillés dans les boîtes « Petawawa » pour germination. La germination a eu lieu dans un incubateur à 27 °C. Après la germination, les plantules ont été plantées dans les pots contenant un mélange de terre noire et de sphaigne (mousse des tourbes). Ces plantules ont été ensuite transférées dans une chambre de croissance pendant 5 mois. Après cette période de croissance, les plantes ont été transplantées dans un mélange de sable de quartz et de sphaigne (50:50) afin de faciliter le déterrement des racines au moment de la récolte et d'améliorer l'absorption des ions métalliques par le système racinaire. Après la transplantation, les plantules ont été placées pendant deux semaines dans un incubateur PGR15 (Conviron) afin de leur permettre de s'acclimater. Les conditions de croissances comprenaient une température journalière maximale de 26 °C et une température nocturne minimale de 18 °C, sur un cycle de noirceur et de lumière de 8 h :16 h. Pendant cette période, les plantules étaient arrosées et fertilisées au besoin.

Afin d'évaluer la toxicité du nickel sur *Q. rubra*, un total de 84 plantes âgées de 6 mois ont été traitées sous des conditions de température et d'humidité contrôlées dans une chambre de croissance avec différentes concentrations de nickel en solution. Les traitements au nickel étaient faits à l'aide d'une solution aqueuse du sel de nitrate de nickel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$). Différentes concentrations de nitrate de nickel représentant les quantités de nickel trouvées sur des sites

contaminés de la RGS étaient administrées aux plantes. Elles comprenaient 0 mg/kg de nitrate de nickel correspondant au traitement contrôle, 150 mg/kg de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ correspondant à la quantité biodisponible de nickel, 1600 mg/kg de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$ qui est l'équivalent de la quantité totale de nickel retrouvé dans le sol. De plus, un traitement intermédiaire a été fait, soit la moitié de la quantité totale de nickel retrouvé dans la RGS (800 mg/kg). La quantité totale représente la concentration la plus élevée de cette expérience. Chacun de ces trois traitements était répété seize (16) fois dans un dispositif en bloc complètement aléatoire pour éviter de biaiser les résultats. Afin de mieux apprécier l'effet du nickel sur les plantes et d'éliminer l'effet potentiellement toxique de l'ion nitrate (NO_3^-), trois traitements au nitrate de potassium (KNO_3) ont été conçus. Ces traitements représentent une quantité d'ions nitrate identique aux traitements de nitrate de nickel soit 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg. Ces traitements étaient répétés 9 fois et représentaient les traitements contrôles pour les différentes doses de nitrate de nickel administrées aux plantes. Le jour de ces traitements au nitrate de nickel marquait le premier jour de cette partie de l'expérience qui a duré 14 jours. Avant l'administration des traitements, la taille des plantes avaient été mesurées à l'aide d'une règle millimétrée. Les mesures subséquentes ont été effectuées le jour 7 et le jour 14 de l'expérience afin de déterminer le taux de croissance des plantes. L'évaluation du taux de dommages aux feuilles était faite tous les deux jours afin d'identifier les génotypes résistants et susceptibles au nickel. Cette évaluation était basée sur une échelle de dommages allant de 1 à 9 tel que décrit par Thériault et Nkongolo (2016) (Tableau 2.0).

- *Extraction de l'acide ribonucléique (ARN)*

Les feuilles et les racines des plantes de *Q. rubra* ont été récoltées à la fin de la période expérimentale (soit 14 jours après les différents traitements) et conservées à -20°C afin de

préserver l'intégrité de l'acide ribonucléique. L'ARN total a été extrait des feuilles et des racines selon le protocole de Chang et al. (1993) avec quelques modifications. Ces modifications comprennent : centrifugation à 15 000 rpm pour 30 minutes au lieu de 20 minutes comme mentionné dans le protocole, l'addition de trois (03) volumes d'éthanol au surnageant avant la précipitation à -70 °C pour 30 minutes, centrifugation pendant 30 minutes pour sédimenter l'ARN, lavage à l'éthanol 70 % pendant 5 minutes avant de sécher et de suspendre la culot d'ARN. Après l'extraction, l'ARN de chaque échantillon a été quantifié à l'aide de la trousse « Qubit® RNA BR assay kit » développé par l'entreprise « Life Technologies » (Carlsbad, États – Unis). Ensuite, La qualité de l'ARN a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Après cette vérification, l'ARN extrait a été mis ensemble pour les différents traitements, résultant en 14 échantillons représentant 3 traitements (150 mg/kg, 800 mg/kg, 1600 mg/kg) et 4 contrôles (le control avec de l'eau et les contrôles au nitrate de potassium) pour les feuilles et les racines. Ces 14 échantillons ont été utilisés par la suite pour l'analyse de l'expression des gènes.

- *Amplification quantitative en chaîne par la polymérase après transcription inverse à temps réel (RT-qPCR)*

L'ARN des 14 échantillons a été traité avec la désoxyribonucléase I (ADNase I) provenant de Life Technologies pour 1 heure à 37 °C. Cette enzyme est une endonucléase qui hydrolyse les liaisons phosphodiester des acides désoxyribonucléiques (ADN). Cette enzyme par son action dégrade l'ADN et permet ainsi d'avoir des échantillons d'ARN qui ne sont pas contaminés par de l'ADN. La quantité traitée à l'ADNase était de 10 µg d'ARN dans un volume réactionnel de 50 µl pour chaque échantillon. La solution finale était composée de 5 µl d'ADNase I, 5 µl de la solution tampon pour réaction PCR et 10 µg d'ARN. Pour atteindre le volume de 50 µl, une quantité suffisante d'eau DEPC (diéthyl pyrocarbonate) était ajoutée à la réaction. Après cette

purification, l'ADNase a été désactivée en augmentant la température à 65 °C pendant 10 minutes suivie de l'ajout d'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique).

Des gènes associés à la résistance au nickel chez d'autres espèces ont été sélectionnés et testés pour leur expression chez *Q. rubra* en utilisant la technique d'amplification quantitative en chaîne par la polymérase après transcription inverse (qRT-PCR) (Tableau 2.1). Les séquences de ces gènes ont été identifiées en analysant la base de données NCBI (Keinänen et *al.*, 2007 ; Kobayashi et *al.*, 2008; Guo et *al.*, 2008). Les amorces utilisées pour les réactions en chaîne par polymérisation (PCR) ont été créées en plusieurs étapes. Tout d'abord, la séquence génomique des gènes choisis a été établie grâce aux données disponibles dans NCBI. Ensuite, les séquences d'ARN messager (ARNm) correspondantes ont été identifiées. Ces séquences ont été analysées en faisant le « BLAST » avec le transcriptome de *Q. rubra* documenté sur le site web « The Hardwood Genomics Project » (<http://hardwoodgenomics.org>) afin de déterminer s'il existe une complémentarité entre les séquences. Ces séquences d'ARNm complémentaires retrouvées dans le transcriptome de *Q. rubra* ont ensuite été exportées au site web Custom Primer-OligoPerfect™ Designer par ThermoFisher scientifique (<https://tools.thermofisher.com/content.cfm?pageid=9716>) où les amorces ont été générées (Tableau 2.2). Ces amorces ont été vérifiées afin de s'assurer qu'il n'y a pas de structure en épingle à cheveux et /ou des autos et hétéro-dimères en utilisant le logiciel OligoAnalyser 3.1 de IDT (<https://www.idtdna.com/calc/analyze>).

L'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) a été synthétisé à partir de l'ARN purifié en utilisant la trousse « High-Capacity cDNA Reverse Transcription » obtenue de Life Technologies dans une réaction de 2 heures à 37 °C. À la Suite de cette synthèse, un PCR a été effectué afin de vérifier l'intégrité de l'ADNc et la taille des amplicons provenant d'une amorce

d'un gène de control interne (α -tubuline). Ensuite, la transcriptase inverse a été inactivée par une hausse de température à 85 °C pour une durée de 5 minutes. De plus, un PCR suivie d'une électrophorèse ont été réalisés sur l'ADN génomique de *Q. rubra* afin de vérifier la taille des produits de l'amplification de chacune des paires d'amorces des gènes ciblés. Les amorces présentant une bande unique (Figure 2.1) et ayant la taille de l'amplicon attendue (Tableau 2.2) ont été utilisées pour le RT-qPCR. Il s'agit des amorces des gènes sérine acétyl transférase (SAT), glutathion réductase (GR), nicotianamine synthase 3 (NAS3), 1-aminocyclopropane-1-carboxylique (ACC), protéine macrophage associées à la résistance naturelle 3 (NRAMP3), famille des protéines de transport à haute affinité (AT2G16800) et des deux gènes de control interne (housekeeping genes) qui sont, le facteur d'élongation 1 α (EF1 α) et la sous unité 18S de l'ARN ribosomique (18S ARNr).

Le RT-qPCR a été accompli en utilisant le kit « DyNAmo HS SYBR Green qPCR master mix » (Thermo Scientific). Le volume des réactions était de 10 μ l contenant 1 μ l d'ADNc dilué. La courbe standard comprenait 7 différents points correspondant aux quantités différentes d'ADNc, soit 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.125 ng et 1.063 ng. Chaque échantillon était amplifié avec trois répétitions en utilisant le thermo cycle MJ Research PTC-200. Ce processus comprenait, (1) une dénaturation initiale à une température de 95 °C pour 15 minutes, (2) une incubation à 94 °C pendant 30 secondes pour continuer la dénaturation, (3) 30 secondes d'hybridation à la température d'hybridation correspondant aux amorces utilisées (Tab.2.2), (4) élongation à 72 °C pendant 30 secondes pour l'élongation des brins d'ADNc par la polymérase, (5) lecture de la fluorescence des tubes (6) répétition des étapes 2-6 pour 41 cycles, (7) incubation à 72 °C pendant 7 minutes pour élongation, (8) courbe de fusion de 72 à 95 °C avec 1°C d'intervalle et attente de 10 secondes, et (9) élongation finale à 72 °C pour 3 minutes. Ce

PCR quantitatif a été réalisé deux fois pour chaque gène et toutes les réactions avaient trois réplications pour chaque échantillon (contrôle avec de l'eau, biodisponible, total, moitié du total et les contrôles correspondants à ces trois derniers). Ceci a abouti à un total de 6 données pour chaque échantillon. Ces données ont été analysées en utilisant le logiciel MJ Opticon Monitor 3.1 (BioRad) et les valeurs delta C(t) et les équations des courbes standards obtenues ont été exportées dans Excel et normalisées avec les deux gènes de contrôle interne (housekeeping genes).

- **Analyses statistiques**

L'expression normalisée de chaque gène ciblé a été déterminée en utilisant les gènes de contrôle interne. Les données ont été analysées en utilisant la version 20 du logiciel SPSS pour Windows. Ces données ont subi une transformation logarithmique (\log_{10}) pour parvenir à une distribution normale. L'analyse des variances (ANOVA) suivie d'une analyse a posteriori de comparaison multiple de Tukey HSD ont été effectuées afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes. Pour ce qui est de l'évaluation de la différence aux niveaux d'expression des contrôles de nitrate et des traitements au nitrate de nickel ainsi que de la différence d'expression entre les tissus, nous avons fait un test t de Student. La valeur alpha pour ces analyses était estimée à 0.05 ; donc les différences étaient considérées significatives pour $P \leq 0.05$.

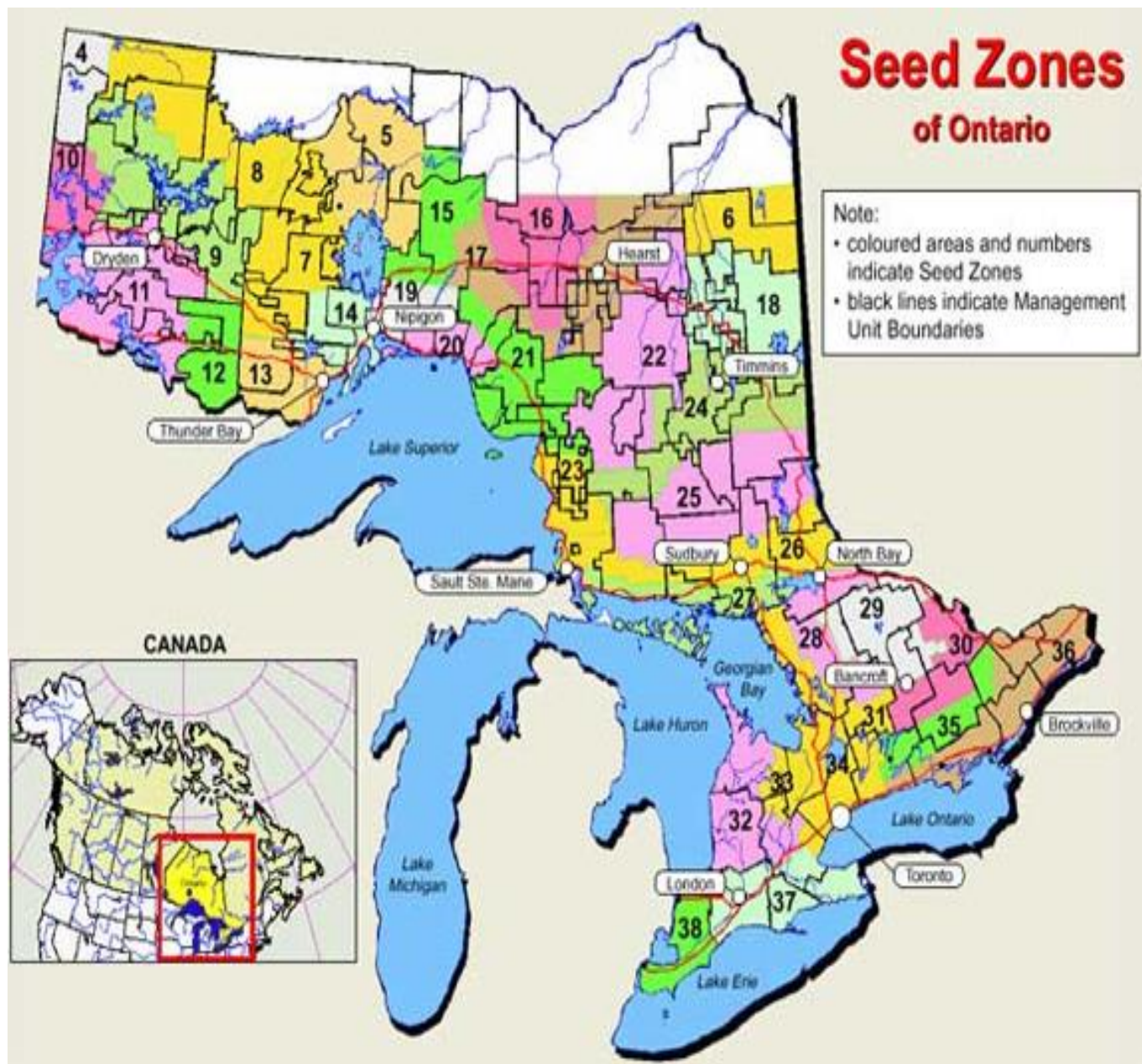


Figure 2.0. Zones de localisation des glands de *Q. rubra* en Ontario, Canada. Les glands utilisés pour cette expérience provenaient de la zone 34 du sud de l'Ontario.

2.2 Résultats

- Toxicité du nickel

L'analyse du taux de dommage et de la croissance des plantes pendant 14 jours n'a révélée aucune différence significative entre les moyennes des différents traitements au nitrate de nickel et les traitements contrôles ($p > 0.05$). Toutes les plantes n'ont montré aucun symptôme de toxicité au nickel, même pour la concentration la plus élevée de 1600 mg/kg après 14 jours (Tableau 2.3).

- Expression génique

Le gène pour l'ACC désaminase était surexprimé au niveau des feuilles pour la dose de 150 mg/kg pour le traitement au nitrate de nickel et son traitement control au nitrate de potassium. Cependant aucune différence n'a été observée entre ces deux traitements aux doses plus élevées de 800 mg/kg et 1600 mg/kg (Figure 2.2 a). On a observé une surexpression de ce gène entre les traitements au nitrate de potassium à la dose de 150 mg/kg comparé au traitement control à base d'eau. Ceci était aussi observé avec une moindre amplitude pour le traitement de 800 mg/kg. Mais, les plantes ayant reçu la plus haute dose de nitrate de potassium (1600 mg/kg) avaient le même niveau d'expression de ce gène que les plantes contrôles (Figure 2.2 b). On a observé une surexpression significative de ce gène quand la plante était traitée avec 800 mg/kg de nitrate de nickel comparé aux autres traitements (Figure 2.2 c). Le niveau d'expression pour la dose la plus élevée (1600 mg/kg) était plus bas que celui de la dose de 800 mg/kg mais significativement plus élevé que celui induit par la dose de 150 mg/kg et du traitement control (0 mg/kg). Il n'y a aucune différence significative dans l'expression de ce gène entre le traitement control et le traitement à 150 mg/kg (Figure 2.2 c).

Au niveau des racines, nous n'avons obtenu aucune amplification pour la quantité biodisponible (150 mg/kg) du traitement au nitrate de potassium. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les contrôles de nitrate et les traitements au nickel et ceci est valable pour toutes les doses (Figure 2.3a). Pour ce qui est des traitements au nitrate de potassium, une expression significative a été observée entre le traitement à 800 mg/kg et les autres traitements (contrôle d'eau et 1600 mg/kg) qui démontraient le même niveau d'expression (Figure 2.3b). Les plantes ayant reçu les doses intermédiaires (800 mg/kg) et élevée (1600 mg/kg) de nitrate de nickel ont eu un niveau d'expression significativement élevée comparativement à celles ayant reçu le traitement le plus bas (150 mg/kg). Cette dernière dose n'a induit aucune différence significative de l'expression de ce gène avec le traitement control (Figure 2.3 c). Aucune différence significative de l'expression de ce gène dans les deux tissus (feuilles et racines) pour le traitement control et le traitement de 150 mg/kg n'a été observé. Des différences significatives ont été observées entre les deux tissus pour les doses de 800 mg/kg et 1600 mg/kg. Dans ce cas, l'expression au niveau des feuilles était plus élevée qu'au niveau des racines (Figure 2.4).

Pour la sérine acétyltransférase (SAT) il n'y avait pas de différence significative d'expression entre les traitements au nickel et leur traitement control (nitrate) pour les doses de 800 mg/kg et 1600 mg/kg. Une surexpression de ce gène a été induite par le nitrate comparé au nickel pour la dose de 150 mg/kg (Figure 2.5 a). Pour les traitements au KNO_3 , la concentration de 150 mg/kg avait induite une expression 6X supérieures par rapport au traitement contrôle et cette expression diminuait quand on augmentait la dose (Figure 2.5b). On a observé une augmentation d'expression au niveau des feuilles pour les plantes exposées à 800 mg/kg et 1600 mg/kg de nitrate de nickel par rapport au traitement à 150 mg/kg et le témoin (Figure 2.5c).

Au niveau des racines, le nitrate induisait une augmentation significativement plus élevée par rapport au nickel à la dose de 800 mg/kg, tandis qu'à la dose de 1600 mg/kg, c'était plutôt le nickel qui générait une expression légèrement plus grande que le nitrate (Figure 2.6a). Lorsqu'on comparait les différents traitements au contrôle, l'expression de ce gène était significativement plus élevée à la dose de 800 mg/kg de nitrate comparée au contrôle (Figure 2.6b). La même tendance était observée pour l'induction par le nickel (Figure 2.6c). Il existe une expression différentielle au niveau des tissus. Dans ce cas, l'expression au niveau des racines était plus élevée que celle des feuilles (Figure 2.7).

Pour le gène NAS3, on a observé une expression différentielle au niveau des feuilles dépendamment des concentrations de nitrate de nickel administrées à la plante. En comparant les traitements au nitrate et ceux au nickel (Figure 2.8a), une différence significative a été observée entre les deux traitements pour les doses de 150 mg/kg et de 1600 mg/kg. Cependant le traitement au nitrate de nickel à la quantité de 800 mg/kg n'a pas eu d'amplification. Le nitrate de potassium a induit une diminution significative de l'expression de ce gène à la dose de 1600 mg/kg comparativement aux autres doses (Figure 2.8b). On a observé une augmentation significative d'expression de ce gène à la concentration de 1600 mg/kg par rapport aux autres doses (Figure 2.8c).

Au niveau des racines, les concentrations de nitrate de nickel et de nitrate de potassium administrées aux plantes n'ont produit aucun changement d'expression du gène NAS3 parce que les niveaux d'expressions sont équivalents à l'expression produite par le traitement contrôle d'eau (Figure 2.9).

2.3 Discussion

- Importance des traitements contrôles

Les métaux lourds doivent être sous leur forme soluble et biodisponible afin d'être assimilés par le système racinaire des plantes. Dans la plupart des expériences faites sur le nickel, les formes les plus utilisées sont les sels de nitrate de nickel et de chlorure de nickel du fait de leur niveau de solubilité élevé et de leur faible coût. Ces sels s'ionisent en $\text{Ni}^{2+}/\text{NO}_3^-$ et $\text{Ni}^{2+}/\text{Cl}^-$ dans de l'eau. Cependant plusieurs analyses négligent l'effet des anions associés à ces sels lors de l'étude de l'effet des métaux lourds chez les plantes (Freeman *et al.*, 2004 ; Douchkov *et al.*, 2005 ; Merlot *et al.*, 2014). Le nitrate et le chlorure peuvent être toxiques pour les plantes si leurs concentrations dans les sols excèdent certains niveau requis pour la croissance des plantes (Parker *et al.*, 1983 ; Goyal et Huffaker, 1984). Cependant, même quand ces éléments sont utilisés à des faibles niveaux, il est toujours important d'évaluer s'ils affectent la croissance des plantes et l'expression des gènes. En effet, l'absorption des nitrates a déjà été associée à la résistance aux métaux dans la littérature (Guan *et al.*, 2015). Dans la présente étude, les traitements au nitrate de potassium présentaient des résultats différents des traitements contrôles (eau) et ceci s'observait beaucoup plus pour les quantités de 150 mg/kg. Ceci suggère que le rôle du nickel dans de nombreuses études utilisant le nitrate de nickel doit être examiné avec précaution pour ne pas mal interpréter les résultats.

- Toxicité du nickel

La toxicité des métaux provoque des dommages visibles chez les plantes incluant la réduction de la croissance des plantes et le changement de couleur des feuilles tel que décrit par Thériault *et al.* (2016) pour l'espèce *B. papyrifera*. Plusieurs plantes sont gravement affectées par des

concentrations élevées de métaux toxiques, mais d'autres sont capables de faire face à la contamination par les métaux lourds en limitant leurs effets. Thériault et Nkongolo (2016) ont observé une réduction de la croissance des tiges chez *B. papyrifera* traité avec des concentrations de nickel dans le sol au taux de 1600 mg/kg et plus, comparativement au contrôle d'eau. Mais dans la présente étude nous n'avons observé aucune différence significative chez *Q. rubra* pour les différentes doses de nickel (150, 800 et 1600 mg/kg) et leurs traitements contrôles respectifs. La quantité biodisponible (150 mg/kg) représente la quantité de nickel qui est réellement assimilable par les plantes. La quantité totale de nickel présente dans le sol n'est pas complètement disponible pour les plantes. La plus grande portion de cette quantité est insoluble et reste liée aux particules du sol. La partie soluble est constituée des ions métalliques en solution qui forment des liaisons avec plusieurs ligands tels que l'ion chlorure (Cl^-), le sulfate (SO_4^{2-}), le nitrate (NO_3^-), et les ligands organiques. Dans cette étude, les plantes ont toutes été traitées avec du nitrate de nickel qui est une forme assimilable de nickel par les plantes. Elles n'ont présenté aucun symptôme phénotypique (chlorose ou nécrose) ni de réduction de croissance même aux doses les plus élevées. Ces différents résultats peuvent potentiellement être expliqués par des différences morphologiques entre *Q. rubra* et *B. papyrifera*. En effet, *Q. rubra* possède une racine pivotante (Lyford, 1980) tandis que *B. papyrifera* possède plutôt des racines fibreuses de petit diamètre (Safford et al., 1990). Les études ont suggéré que la surface du système racinaire peut avoir un impact sur l'absorption des métaux lourds tel que le nickel. Ainsi cette différence morphologique au niveau racinaire peut potentiellement entraîner une différence d'assimilation des métaux lourds entre ces deux espèces (Keller et al., 2003). Toutefois, autres recherches seraient nécessaires pour élucider ces différences.

- Régulation des gènes

Des études ont montré que certains métaux particuliers tels que le nickel, le cuivre et le cobalt ont des effets génotoxiques. L'analyse des systèmes subcellulaires et acellulaires a montré les effets de divers métaux sur l'ADN. Par exemple, le chrome et le nickel ont induit des changements génétiques en interagissant avec l'ADN dans l'étude d'Aras et *al.* (2002). Plusieurs gènes peuvent être activés suite à l'exposition aux métaux lourds (Price-Haughey et *al.*, 1986). Il s'agit par exemple des gènes contrôlant la synthèse de l'acide 1- aminocyclopropane-1-carboxylique désaminase (ACC désaminase), la sérine acétyltransférase (SAT), la nicotianamine synthase 3 (NAS 3) et la famille des protéines macrophage associées à la résistance naturelle (AT2G16800).

L'augmentation des niveaux d'éthylène dans les plantes à la suite de l'exposition à divers types de stress, y compris la chaleur, la sécheresse, l'inondation, l'infection pathogène, le stress nutritionnel et les métaux lourds, entraîne des dommages aux tissus végétaux (Hyodo, 1991 ; Grichko et Glick, 2001 ; Mayak et *al.*, 2004). Des informations sur le rôle précis de l'éthylène dans les symptômes de la maladie ou du stress sont encore ambiguës en raison de l'enchevêtrement des interactions entre l'éthylène et les autres hormones végétales. Cependant, il a été démontré qu'une réduction des niveaux d'éthylène améliore la survie des plantes de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Grichko et *al.*, 2000) et de canola (*Brassica napus*) (Nie et *al.*, 2002) lorsqu'elles sont exposées aux métaux lourds tels que le Nickel. L'ACC est le précurseur immédiat de l'éthylène dans les plantes (Abeles et *al.*, 1992). L'enzyme ACC désaminase bactérienne est la seule enzyme qui métabolise l'ACC. Cette enzyme convertit l'ACC en acétobutyrate et en ammoniac et entraîne de ce fait la réduction de la production d'éthylène à la base des effets phytotoxiques des contaminants (Honma et Shimomura, 1978). Les plantes de

tomates transgéniques qui expriment l'ACC désaminase produisent moins d'éthylène et par conséquent les effets du stress sont réduits (Klee et *al.*, 1991). Ainsi les plantes exprimant l'enzyme ACC désaminase sont capables de tolérer les effets délétères des facteurs de stress environnementaux (Singh et *al.*, 2015). L'analyse des séquences d'ADN a révélé la présence des gènes ACC désaminase dans les génomes de plusieurs plantes, et il existe des preuves que les plantes *Arabidopsis* et *Populus spp* expriment l'activité ACC désaminase (Glick, 2005). Ces résultats suggèrent que l'expression de l'ACC désaminase devrait être élevée en fonction des doses de nickel administrées aux plantes. Dans cette étude, l'amplification de l'ADN de *Q. rubra* a révélé la présence du gène ACC désaminase.

L'expression de l'ACC désaminase au niveau des feuilles dans cette étude a été induite par la dose de 150 mg/kg. Les traitements au nitrate de nickel de 150 mg/kg et 800 mg/kg ont induit une augmentation du niveau d'expression comparativement au traitement control mais ce changement dans l'expression n'est pas dû au nickel seul. En effet on a observé une différence d'expression avec des traitements au nitrate de potassium comparé au traitement control (avec l'eau), ce qui suggère que le nitrate joue un rôle dans ce changement. Toutefois à la concentration la plus élevée (1600 mg/kg), on a observé une diminution de l'expression de ce gène par rapport à l'expression observé à la quantité intermédiaire (800 mg/kg). Ceci suggère que ce gène possède une quantité seuil à partir de laquelle son expression est réprimée. Cependant, les études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Au niveau des racines, une augmentation du niveau d'expression a été observée pour la dose de 800 mg/kg. Cette différence semble être due au nitrate et non au nickel. Dans une étude faite en 1991, Klee et ses collègues ont montré que l'ACC désaminase avait une expression plus élevée au niveau des feuilles de jeunes plantes de tomates transgéniques parce que les effets néfastes de

l'éthylène y étaient plus réduits. Dans la présente étude, nous remarquons que ce gène a effectivement une expression différentielle au niveau des tissus et ceci a été observé pour les traitements de 800 mg/kg et de 1600 mg/kg. L'expression au niveau des feuilles était significativement plus grande qu'au niveau des racines.

La sérine acétyltransférase (SAT) catalyse la réaction d'acétylation de la L-sérine pour produire l'O-acétyl-L-sérine, un régulateur positif de l'assimilation du soufre et un intermédiaire dans la biosynthèse de l'acide aminé cystéine. Lors de l'exposition d'une plante aux quantités élevées de Ni, cette enzyme est surexprimée afin de contrer les effets néfastes liés au stress oxydatif (Freeman et *al.*, 2004). Dans la présente étude, l'expression obtenue pour les feuilles à la dose de 1600 mg/kg de nitrate de nickel est due au nickel parce qu'il existe une différence significative entre le traitement au nickel et le traitement au nitrate à cette concentration. Le traitement au nickel induisant une expression plus élevée que son contrôle au nitrate. Ceci suggère que ce gène est influencé par le nickel lorsqu'exposé à des doses élevées. Ces résultats corroborent avec les données de l'étude faites sur la régulation du cadmium chez *Arabidopsis thaliana* qui avaient montré une haute expression de SAT à des concentrations élevées de ce métal (Howarth et *al.*, 2003). Une comparaison biochimique entre *T. goingense* et *A. thaliana*, a révélé que *T. goesingense* (qui est un accumulateur de Ni) présente une activité plus élevée de l'enzyme SAT qui est en partie responsable de la tolérance au Ni observée chez cette espèce (Freeman et *al.*, 2004 ; Freeman et Salt, 2007). Le pic d'expression observé à 800 mg/kg peut être attribué au nitrate parce qu'il existe une différence entre le nitrate et le nickel à cette concentration ; le nitrate induisant une expression plus élevée. Les études faites auparavant ont démontré une expression élevée de ce gène au niveau des racines comparativement aux feuilles (Kawashima et *al.*, 2005). Les résultats obtenus dans la présente étude sont en accord avec cette

conclusion car, l'expression de SAT était plus élevée au niveau des racines pour la concentration de 800 mg/kg. Le manque d'amplification des échantillons de racines traitées à la concentration de 150 mg/kg de nitrate de potassium peut être expliqué par une dégradation de l'ADNc synthétisé ou la présence d'un inhibiteur dans l'échantillon. Toutefois cette explication n'est pas incontestable.

L'identification récente de Ni^{2+} complexé au chélatant métallique de haute affinité nicotianamine (NA) dans l'hyperaccumulateur de Ni et de Zn *T. caerulescens* (Vacchina et al., 2003) suggère que la nicotianamine joue un rôle important dans la détoxification du Ni extravacuolaire chez les plantes hyperaccumulatrices. La surproduction constitutive de la nicotianamine et de l'enzyme responsable de sa biosynthèse, la nicotianamine synthase (NAS), chez *T. caerulescens* et l'hyperaccumulateur *A. halleri* (Vacchina et al., 2003; Becher et al., 2004; Weber et al., 2004) supporte cette conclusion et suggère que la surproduction de nicotianamine est un mécanisme général sous-jacent à l'hyperaccumulation de Ni / Zn dans la famille des *Brassicaceae*. Au vu de ces résultats, la NAS devrait également avoir une expression élevée au niveau des plantes exposées à de fortes doses de nickel. Dans la présente étude, une augmentation relative d'expression de ce gène est observée au niveau des feuilles des plantes exposées à une dose élevée de nitrate de nickel. Cette surexpression peut être attribuée au nickel parce que l'expression due au nickel est significativement supérieure à celle induite par le nitrate à cette concentration. Ceci suggère que le nickel est effectivement impliqué dans l'activation et l'expression de ce gène comme démontré par Weber et al. (2004). Une étude récente a montré que NAS2 était exprimé dans les racines tandis que NAS3 était exprimé uniquement dans les feuilles de l'espèce *A. thaliana* où il était réprimé par un déficit en Fe mais fortement induit par la présence de Ni. Chez les fleurs, NAS3 était exprimé dans les sépales et pétales tandis que

NAS1, NAS2 et NAS4 n'y étaient pas exprimés (Bauer et Schuler, 2011). Dans la présente étude, NAS3 présente un changement d'expression uniquement dans les feuilles, ce qui est parfaitement en accord avec les résultats de Bauer et Schuler (2011). NAS3 semble important pour la production de nicotianamine dans les feuilles et contribue de ce fait à l'apport en Fe (en cas de déficience en Fe) et à la tolérance au Ni (en cas d'exposition au Ni) (Bauer et Schuler, 2011).

2.4 Conclusion

Dans la présente étude, nous n'avons observé aucun dommage ni de ralentissement de croissance causés par le nickel sur les plantes qui ont été traitées avec différentes doses de nitrate de nickel. Nous avons vérifié si des gènes connus comme jouant un rôle dans la résistance au nickel chez d'autres espèces sont impliqués dans les réponses de *Q. rubra* exposé aux différentes doses de nitrate de nickel. Il a été montré que les trois gènes analysés (ACC désaminase, SAT et NAS3), ont une expression différentielle chez cette espèce variant selon les traitements et les tissus. NAS3 présente une surexpression due au nickel dans les feuilles à la concentration de 1600 mg/kg mais aucune expression dans les racines. ACC désaminase et SAT sont beaucoup plus influencé par le nitrate. ACC désaminase a une expression plus élevée dans les feuilles et les concentrations de 150 mg/kg et 800 mg/kg induisent une expression plus élevée de ce gène tandis qu'une répression est observée à la dose de 1600 mg/kg. Au niveau des racines, le nitrate induit une surexpression de l'ACC désaminase à partir de la concentration de 800 mg/kg. Le gène SAT est plus exprimé au niveau des racines et son induction par le nitrate nécessite une concentration minimale de 800 mg/kg. Ce gène nécessite une quantité de 1600 mg/kg pour être induit par le nickel. En somme le nitrate et le nickel sont tous deux responsables de l'expression

des gènes impliqués dans la tolérance au nickel. Toutefois des études supplémentaires sont nécessaires.

Tableau 2.0. L'évaluation de dommages aux plantes selon une échelle d'évaluation de 1 (sans dommages) à 9 (plantes mortes) après traitements au nickel.

Pourcentage de surface feuillue affectée par la chlorose et/ou la nécrose	Côte de dommage	Classification des géotypes
0-10	1	Résistant
10-20	2	
20-30	3	
30-40	4	Moyennement susceptible
40-50	5	
50-60	6	
60-70	7	Susceptible
70-80	8	
>80	9	

Tableau 2.1. Gènes ciblés pour évaluer la résistance au nickel chez *Q. rubra*

gènes ciblés	Espèces d'identification	Référence
Serine acetyltransferase (SAT)	<i>Thlaspi goesingense</i>	Freeman et al., 2004
Glutathione reductase (GR)	<i>Thlaspi goesingense</i>	Freeman et al., 2004
Nicotianamine synthase (NAS3)	<i>Noccaea caerulescens</i>	Visioli et al., 2014
	<i>Thlaspi caerulescences</i>	Mari et al., 2006
Metal transporter Nramp3	<i>Noccaea coaerulescens</i>	Visioli et al., 2014
1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase(ACC)	<i>Brassica napus</i>	Stearns et al., 2005
High affinity nickel transporter family protein (AT2G16800)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Wang et al., 2007

Tableau 2.2. Séquences des amorces utilisées pour RT-qPCR, la taille du produit d'amplification attendue et obtenue et les températures d'hybridation de chaque gène.

Gènes cibles/ gènes de contrôle interne	Séquence des paires d'amorces	Taille d'amplicon attendue (pb)	Taille d'amplicon obtenue par PCR (pb)	Température d'hybridation (°C)
SAT	F:GCAACTGGTGTGTGATTGG R:CTCCAATCTTTGGGTGCCTA	118	118	55
GR	F:TGTTCCAAAATGAGCCAACA R:CACATGTGCAATCCCAGAAC	241	241	55
NAS 3	F:GCCTCCAAACACCTTACCAA R:CCTCTTTGTCCATGCCAACT	205	205	55
NRAMP 3	F:TGCTTGGATGTTTGGTGAAA R:AAACCCTTTGGCAAACACAG	292	292	55
ACC	F:GGGCACAATTGCTGGTCTAT R:TCCTCAGGGGTGTTAATTGC	207	207	55
AT2G16800	F:ATGATGGTCTTGCCAGCTCT R:GCAATTGCTACAAGGAAGC	194	194	55
Gènes de contrôle interne				
EF1α	F: GCACTCTCTGAGGCTCCATC R: TCTTCACCGAAAAGGTCCAC	187	187	55
18 S ARNr	F: GACTGTGAAACTGCGAATGG R: ATGCATCCCTTCCAGAAGTC	370	370	55

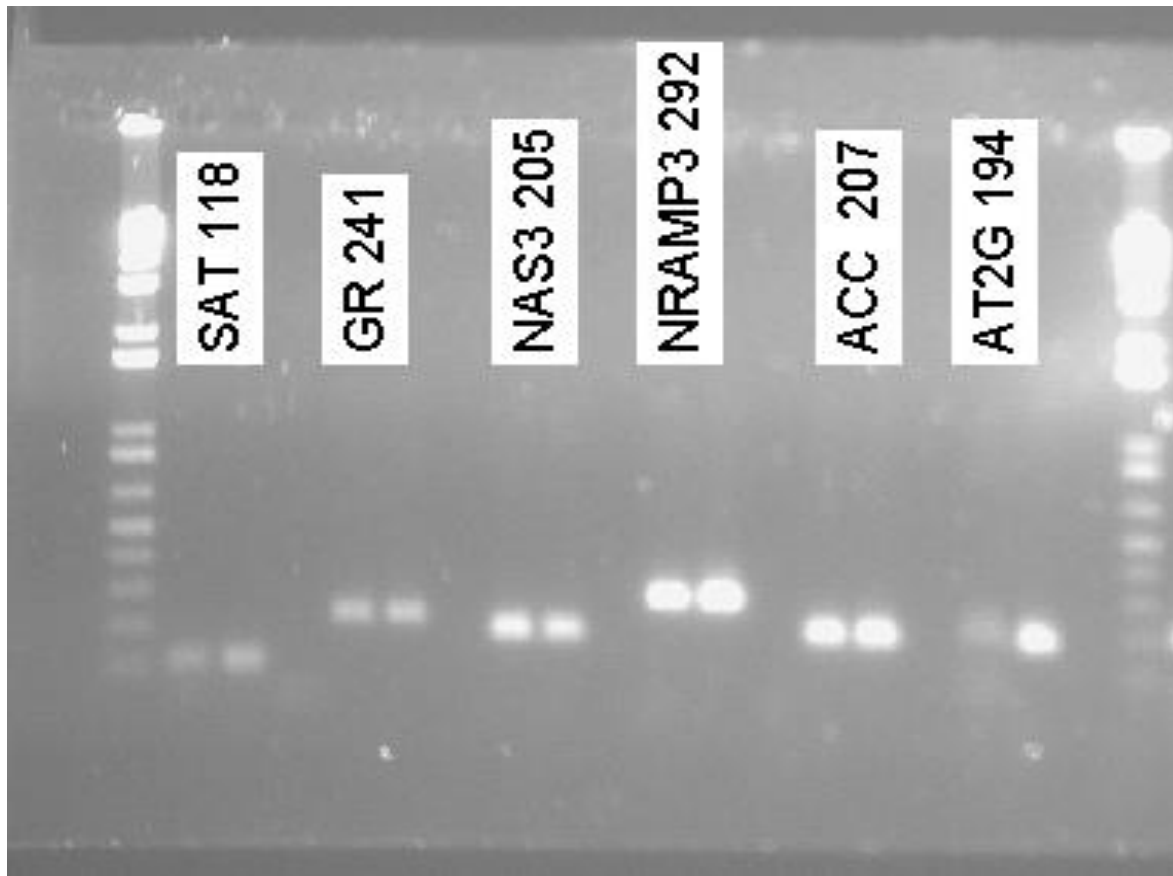


Figure 2.1. Produits d'amplification des amorces synthétisées pour les gènes ciblés (SAT, GR, NAS3, NRAMP3, ACC désaminase et AT2G16800) provenant du PCR de l'ADN de *Q. rubra*.

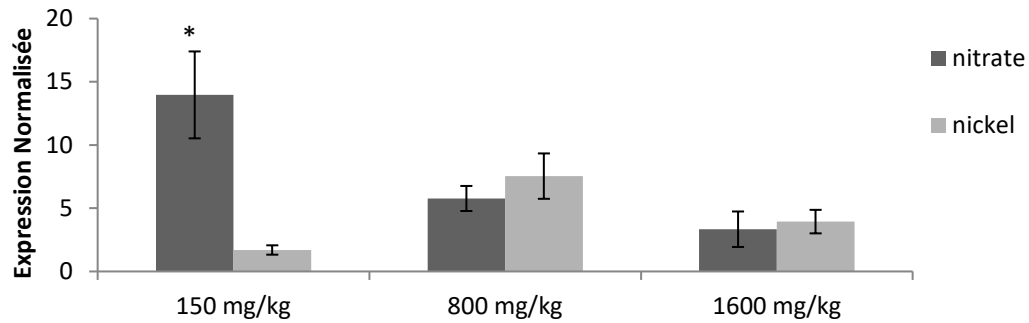
Tableau 2.3. Moyennes (\pm ES) des cotes de dommage et de la croissance de *Q. rubra* suite aux différents traitements avec le nitrate de nickel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$) et le nitrate de potassium (KNO_3) à la fin de la période expérimentale (14 jours).

Traitement		Cote de dommage * (échelle 1 à 9)	Croissance en 14 jours (cm) **
Ni(NO₃)₂	150mg/kg	1.0 \pm 0.0	0.56 \pm 0.36
	800mg/kg	1.0 \pm 0.0	0.44 \pm 0.34
	1600mg/kg	1.0 \pm 0.0	0.53 \pm 0.46
KNO₃	150mg/kg	1.0 \pm 0.0	0.44 \pm 0.36
	800mg/kg	1.0 \pm 0.0	0.78 \pm 0.44
	1600mg/kg	1.0 \pm 0.0	0.44 \pm 0.30
Contrôle d'eau	0	1.0 \pm 0.0	0.5 \pm 0.35

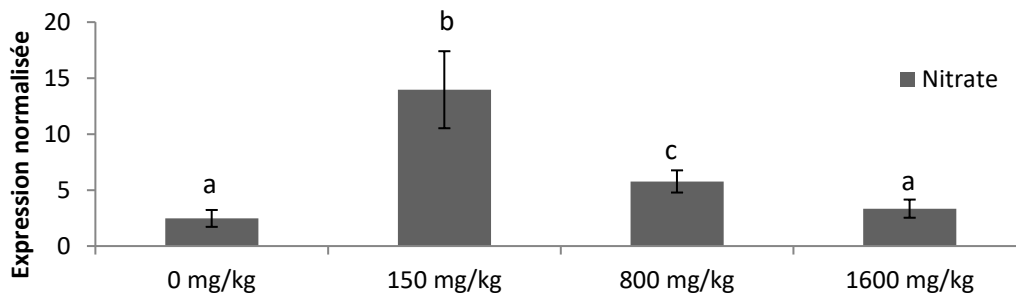
* L'évaluation des dommages basée sur l'échelle de 1 à 9 où 1 représente des plantes sans dommages et 9 des plantes mortes ou mourantes.

** Croissance déterminée par la différence de la taille des plantes entre le jour 14 (après traitements) et le jour 0 avant les traitements.

a)



b)



c)

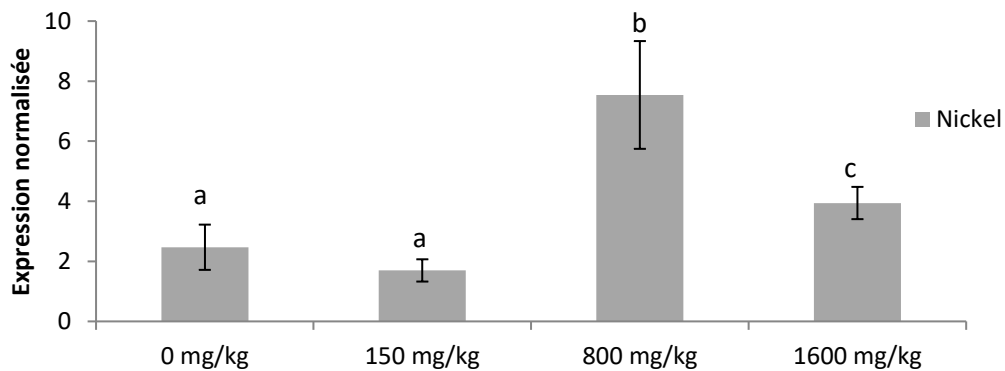
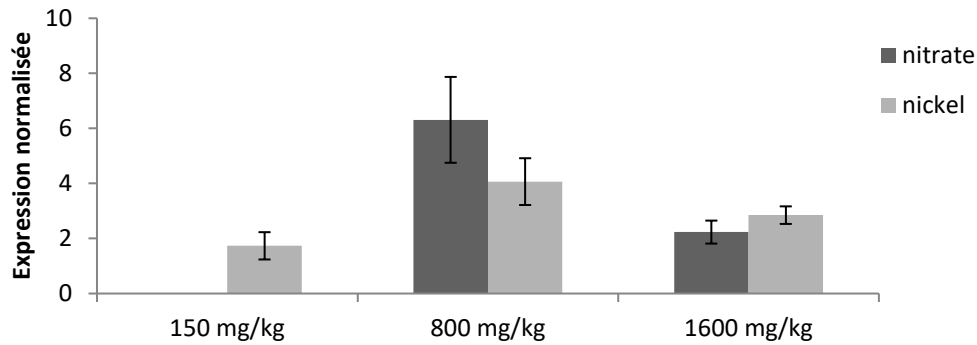
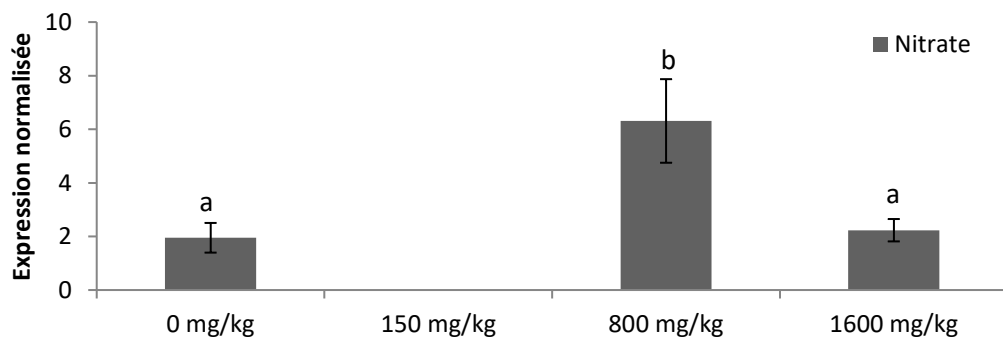


Figure 2.2. Expression de ACC désaminase au niveau des feuilles de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de ACC désaminase a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entres les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey ($P \geq 0.05$).

a)



b)



c)

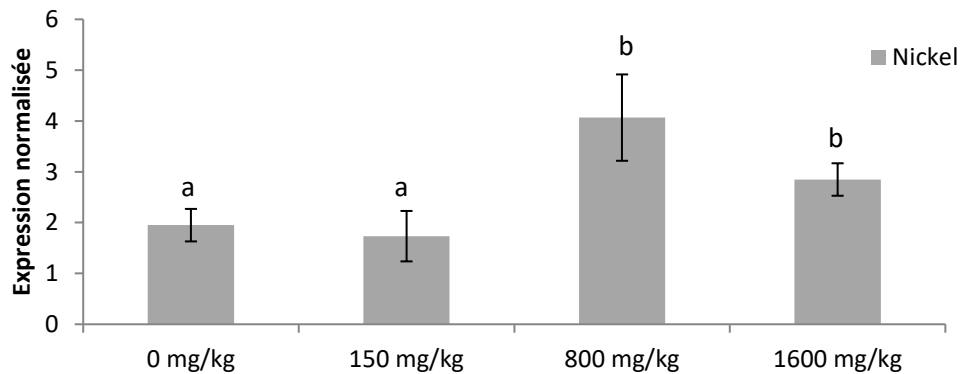


Figure 2.3. Expression de ACC désaminase au niveau des racines de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de ACC désaminase a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey ($P \geq 0.05$).

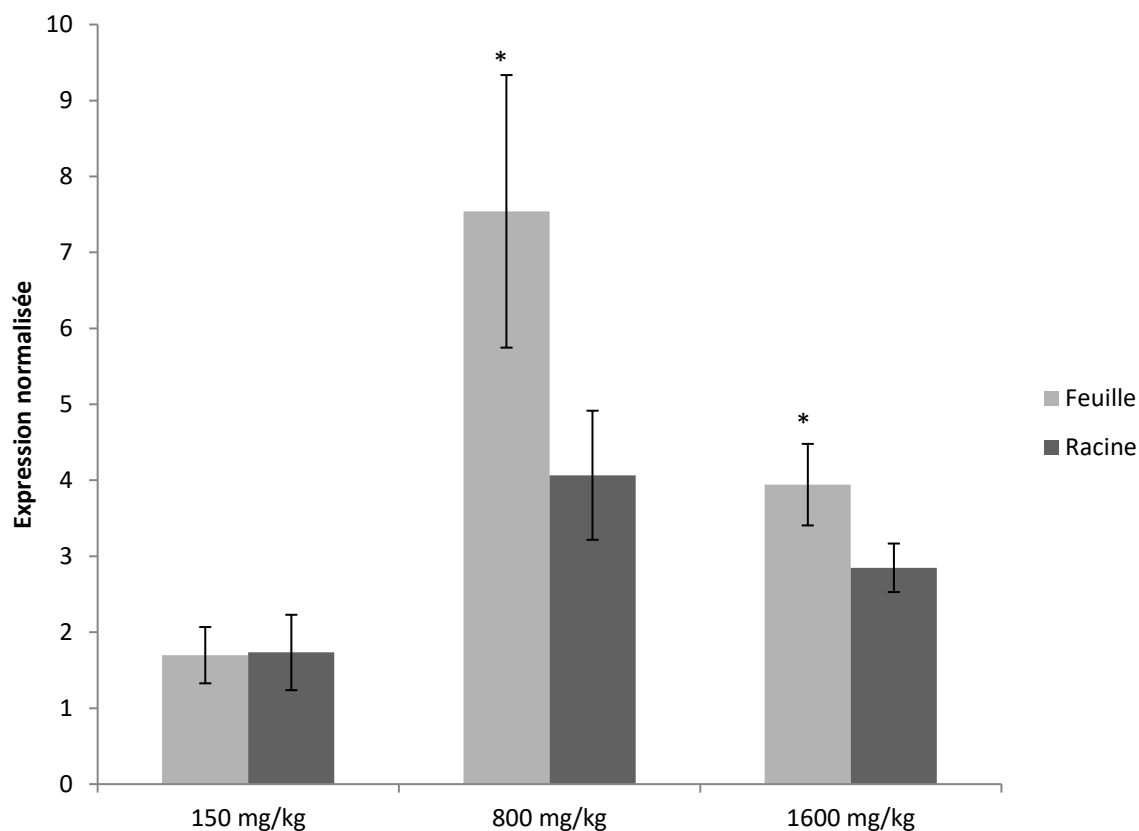
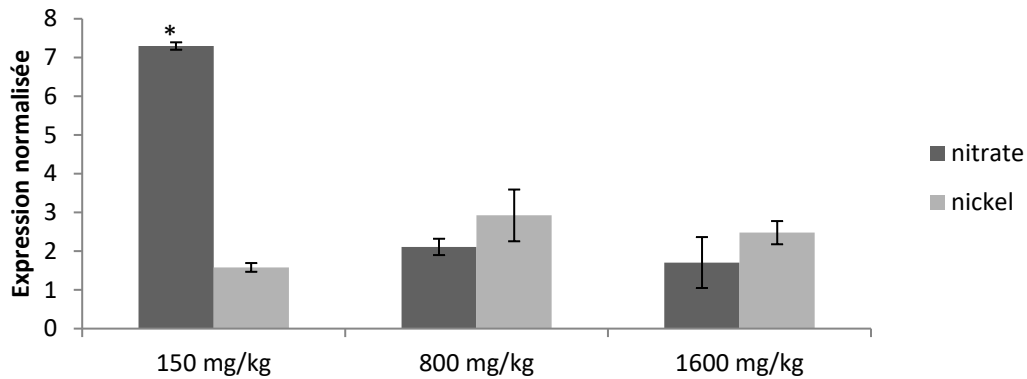
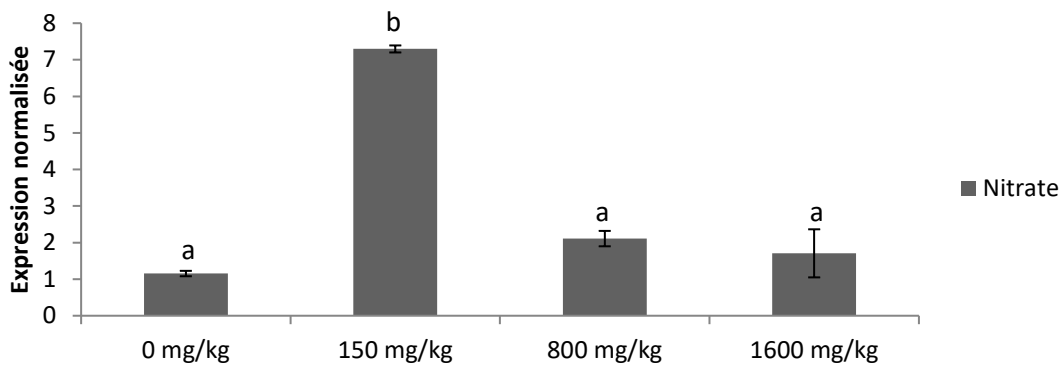


Figure 2.4 Expression d'ACC désaminase au niveau des feuilles et des racines de *Q. rubra* pour les traitements au nitrate de nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg. L'expression de ACC désaminase a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student ($P \leq 0.05$).

a)



b)



c)

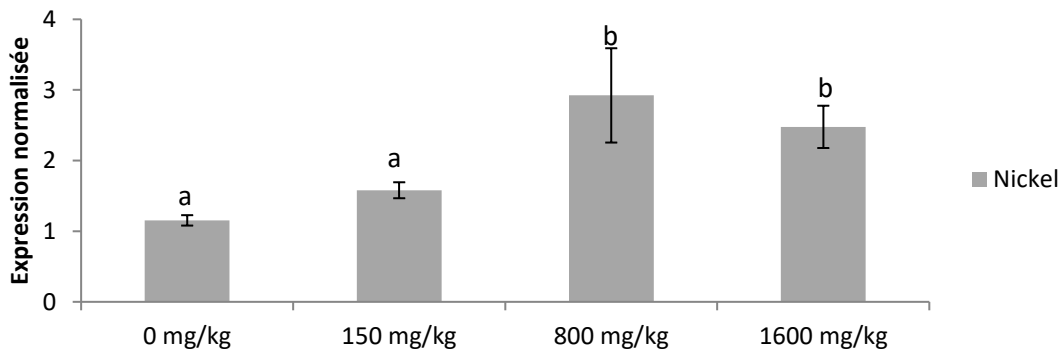
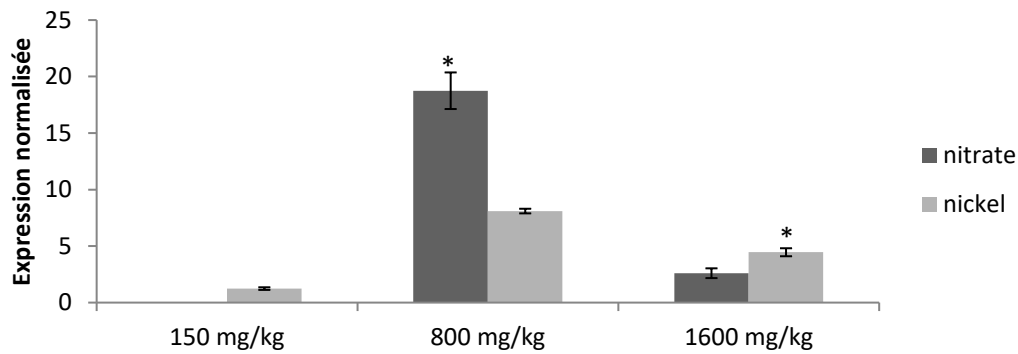
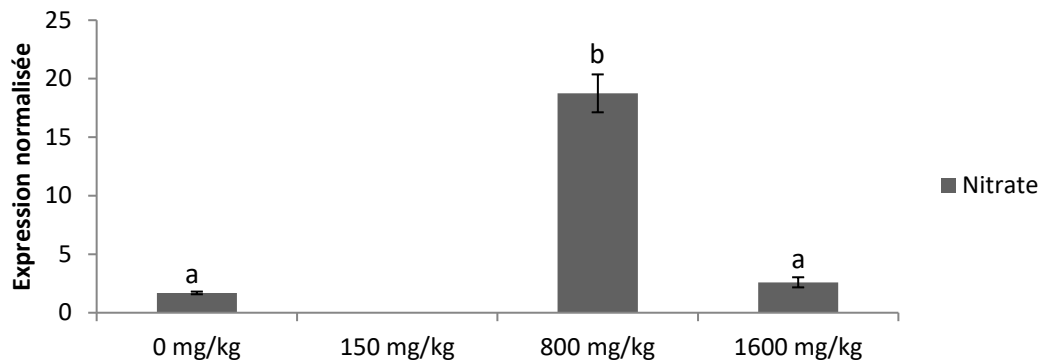


Figure 2.5. Expression de la sérine acétyltransférase (SAT) au niveau des feuilles de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).

a)



b)



c)

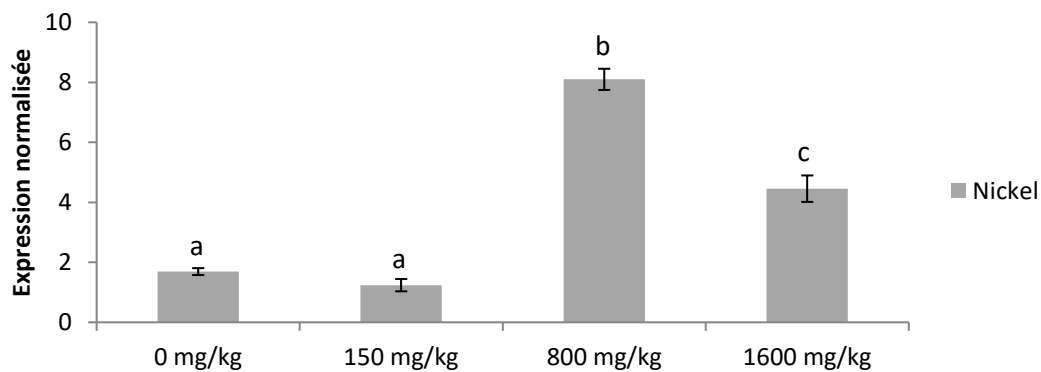


Figure 2.6. Expression de la sérine acétyltransférase (SAT) au niveau des racines de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).

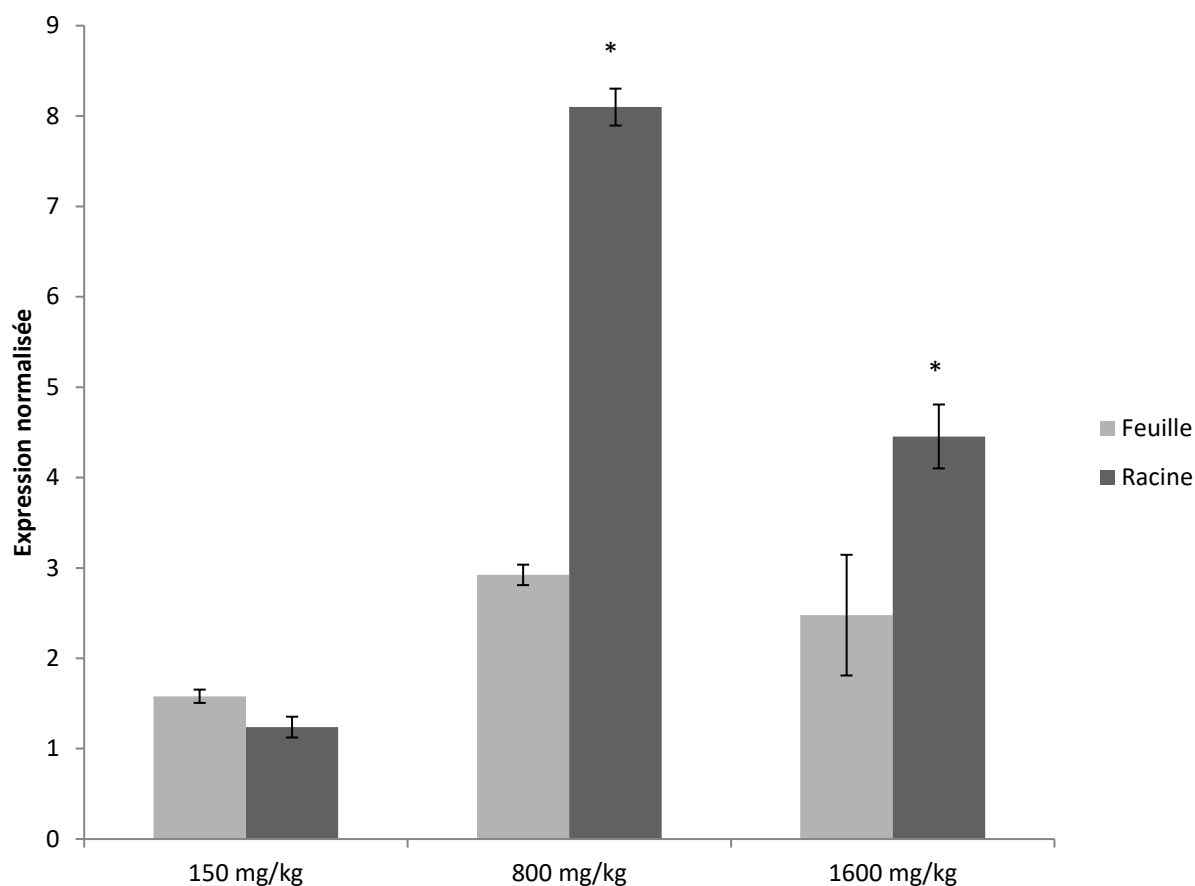
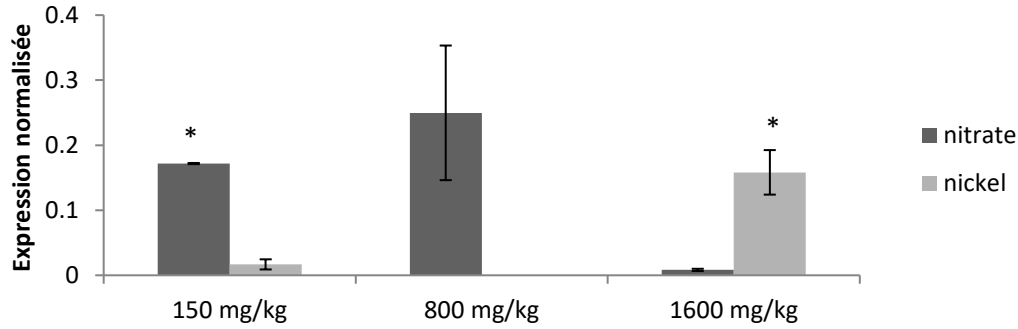
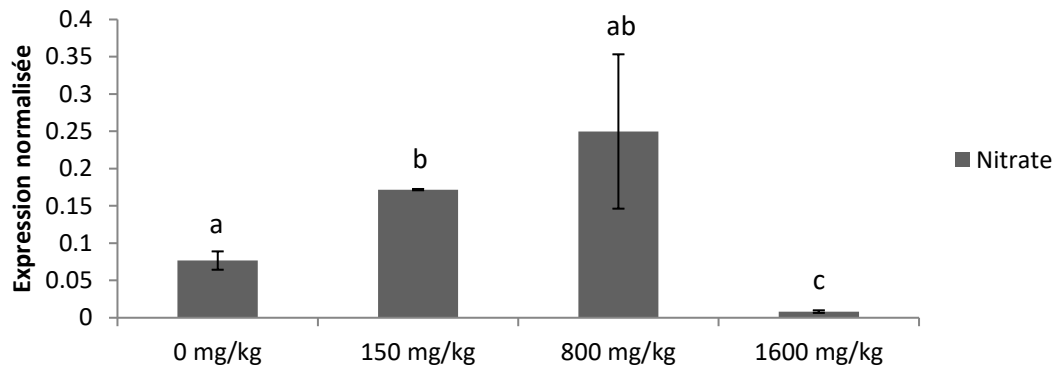


Figure 2.7 Expression de la sérine acétyltransférase (SAT) au niveau des feuilles et des racines de *Q. rubra* pour les traitements au nitrate de nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées par le test t de Student ($P \leq 0.05$)

a)



b)



c)

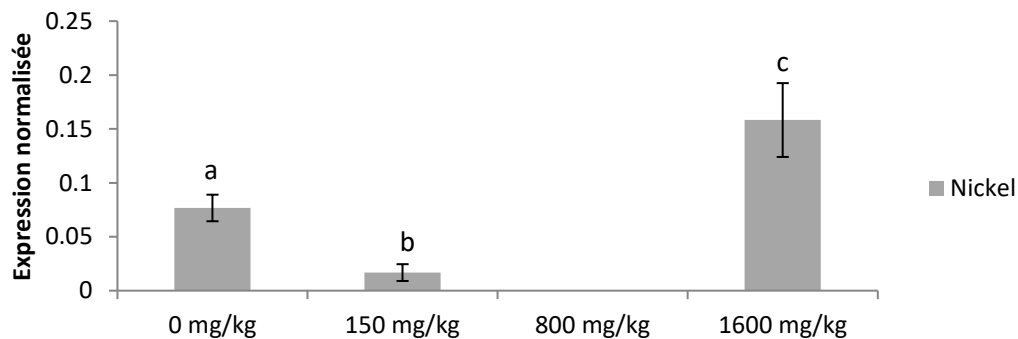
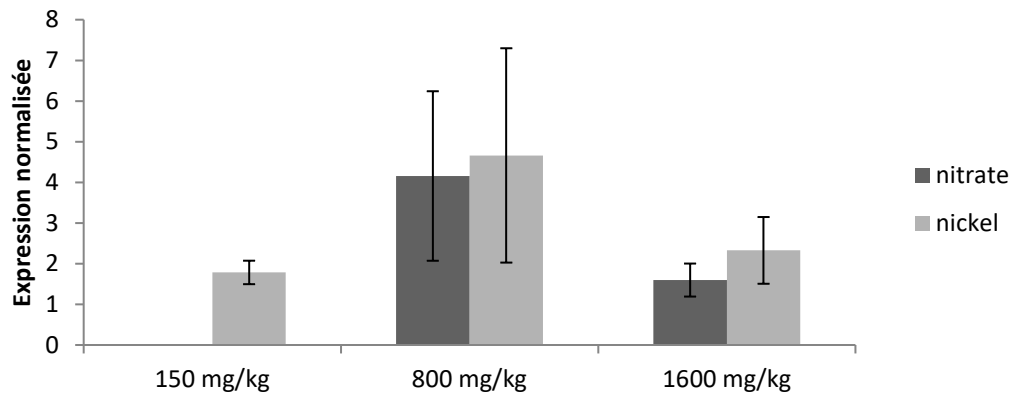
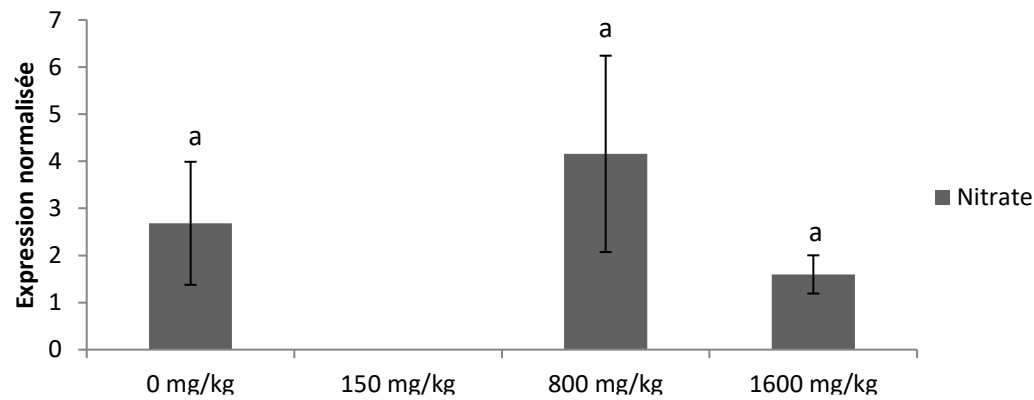


Figure 2.8. Expression de la Nicotianamine synthase 3 (NAS3) au niveau des feuilles de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de NAS3 a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les différences significatives (*) entre les groupes ont été déterminées avec le test t de Student. Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).

a)



b)



c)

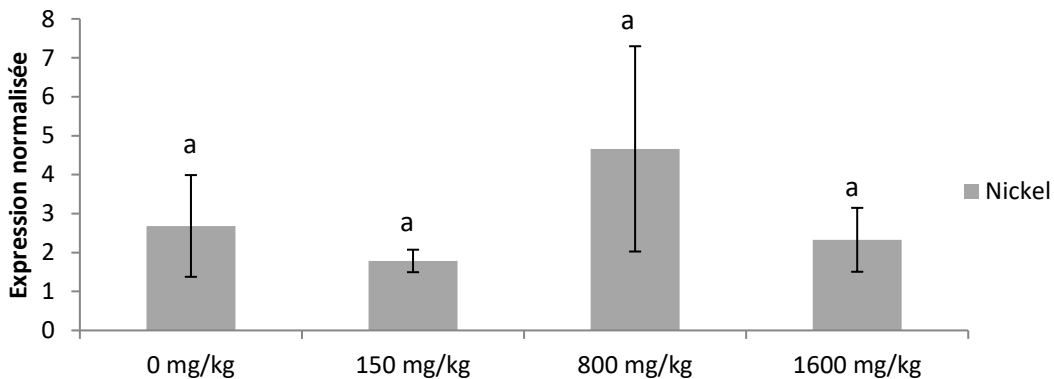


Figure 2.9. Expression de la nicotianamine synthase 3 (NAS3) au niveau des racines de *Q. rubra* pour (a) les traitements au nickel de 150 mg/kg, 800 mg/kg et 1600 mg/kg avec leur traitement contrôle de nitrate respectif ; (b) contrôles de nitrate (NO_3^-) et le contrôle d'eau ; (c) traitement au nickel et le contrôle d'eau. L'expression de NAS3 a été normalisée par le gène de contrôle interne EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Dunnett T3 ($P \geq 0.05$).

CHAPITRE 3 : EXPRESSION DE GENES ASSOCIES A LA RESISTANCE AU NICKEL CHEZ LES POPULATIONS DE CHENE ROUGE (*QUERCUS RUBRA*) PROVENANT DES ZONES CONTAMINEES AVEC DES METAUX DU NORD DE L'ONTARIO

3.0. Introduction

La région du Grand Sudbury en Ontario contient l'un des principaux gisements de minerai de Ni et de Cu au monde, ainsi que des quantités non négligeables de nombreuses autres sulfures métalliques (Winterhalder, 1995). En raison des quantités massives de minerais fondus chaque année et en raison de sa teneur élevée en soufre, les émissions de SO₂ ont été inégales partout ailleurs dans le monde (Hutchinson & Whitby, 1977). Les espèces d'arbres qui ont réussi à croître sur ces sols contaminés sont principalement *Betula papyrifera*, *Acer rubrum*, et *Quercus rubra* sur les sites plus secs et *Populus* dans les zones plus humides (Freedman et Hutchinson 1980, Kirkey et al., 2012).

Bien que de nombreuses études aient signalé des mécanismes de résistance aux métaux chez les espèces herbacées, il existe très peu d'information en ce qui concerne les espèces feuillues tel que *Q. rubra*. Ces mécanismes varient largement entre les espèces, cependant, il existe une cohérence entre les taxons pour certains mécanismes tels que, la réduction de l'absorption des métaux, le stockage des métaux dans les trichomes de l'épiderme pour éviter leur effet direct sur le mésophile, la précipitation et la chélation des métaux dans les organes spéciaux de désintoxication, une augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans l'élimination des radicaux libres et production de protéines spécifiques impliquées dans la réduction de l'impact des métaux (Cheng, 2003). En ce qui concerne le chêne rouge (*Q. rubra*), les mécanismes de

résistance aux métaux ainsi que les gènes impliqués dans cette résistance sont encore peu connues.

L'objectif spécifique de cette étude était de déterminer l'expression des gènes impliqués dans la résistance au nickel chez les populations de *Q. rubra* dans des sites contaminés et les sites de référence de la région du Grand Sudbury.

3.1. Matériel et méthode

- *Echantillonnage*

Des échantillons de feuilles et de racines de *Q. rubra* ont été prélevés dans six sites différents autour de la RGS. Dix arbres représentatifs de chaque site ciblé ont été sélectionnés pour l'étude. Ces zones d'étude comprenaient trois sites contaminés avec les métaux (Kelly Lake, Laurentienne et Wahnapiatae Hydro Dam) situés dans un rayon de dix kilomètres des fonderies de Sudbury et trois sites de référence non contaminés (Capreol, St-Charles et Killarney) se trouvant à environ 120 kilomètres des fonderies de Sudbury (Figure 3.0). Les détails sur les quantités totales et biodisponibles de différents métaux sont décrits dans Nkongolo et *al.* (2013), Mehes-Smith et Nkongolo (2015) et Kalubi et *al.* (2016). Des échantillons de feuilles et de racines ont été enveloppés dans des feuilles d'aluminium, immergés dans de l'azote liquide et conservés à -20 °C jusqu'à l'extraction de l'acide ribonucléique (ARN).

- *Extraction de l'acide ribonucléique (ARN)*

L'extraction d'ARN s'est déroulée exactement comme dans l'étude précédente décrite au chapitre 2, avec 10 échantillons par sites pour un total de 60 échantillons. L'ARN a été extrait uniquement au niveau des racines.

- *Amplification quantitative en chaine par la polymérase après transcription inverse à temps réel (RT-qPCR)*

Cette partie de l'expérience s'est déroulée aussi comme décrit au chapitre 2. L'ARN extrait a été traité à l'ADNase afin de purifier les échantillons. La synthèse de l'ADNc a suivi cette purification et l'amplification des gènes a été faite en utilisant les échantillons d'ADNc synthétisés. Les amorces des gènes utilisés sont décrites dans le tableau 2.2.

Analyses statistiques

Les données obtenues des RT-qPCR ont été analysées en utilisant le logiciel MJ Opticon Monitor 3.1 par BioRad. Les valeurs C(t) et les équations des courbes standards obtenues de ce logiciel ont été exportées dans un document Excel. Les valeurs C(t) ont été quantifiées et les données obtenues ont été normalisées avec deux gènes de régulation interne (EF1 α et 18S ARNr). Les analyses statistiques ultérieures, soit l'analyse des variances (ANOVA) et le test à postériori de Dunnett T3 pour les gènes SAT, ACC, NAS3 et AT2G16800 et le test de Tukey HSD pour les gènes GR et NRAMP, ont été faites à l'aide du logiciel SPSS 20 pour Windows afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes ($p \leq 0,05$).

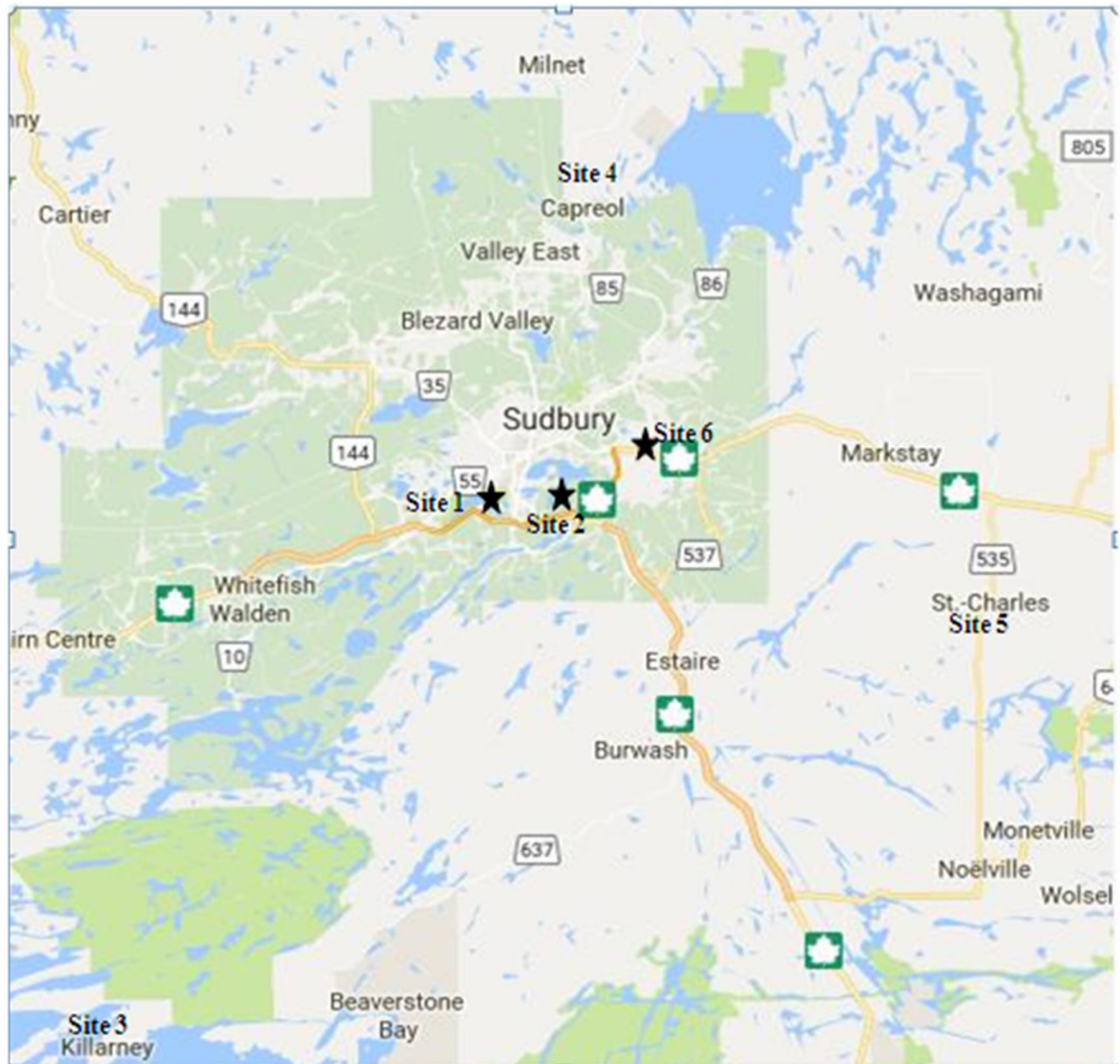


Figure 3.0. Localisation des sites d'échantillonnage de *Q. rubra* dans la région du Grand Sudbury au Nord de l'Ontario. Site 1: Kelly Lake, site 2 : Laurentienne, site 3 : Killarney, site 4 : Capreol, site 5 : St-Charles et site 6 : Wahnapiatae Hydro Dam

3.2. Résultats

Toutes les paires d'amorces développées pour les gènes ciblés étaient fonctionnelles pour l'analyse au qRT-PCR puisqu'elles ont généré des amplicons de tailles attendues (Tableau 2.2). L'analyse par qRT-PCR, a démontré une expression de tous les gènes utilisés soient, la sérine acétyltransférase (SAT), l'acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique désaminase (ACC désaminase), le glutathion réductase (GR), la nicotianamine synthase 3 (NAS3), la protéine macrophage associé à la résistance naturelle (NRAMP 3) et la famille des protéines de transport à haute affinité (AT2G16800). Le niveau d'expression le plus élevé pour tous ces gènes était observé dans les échantillons du site de référence sans contamination par les métaux Capreol (Figure 3.1 et 3.2). À l'exception des gènes SAT et NRAMP3, le niveau d'expression le plus bas était observé dans les échantillons du site Wahnapiatae-Hydro Dam qui est un des sites contaminés avec des métaux (Nkongolo et *al.*, 2013). En dehors de ces deux sites il n'y avait pas de différences significatives dans l'expression des gènes entre les sites contaminés et les sites de référence. (Figure 3.1 et 3.2)

3.3. Discussion

Les activités minières conduisent souvent à des problèmes de toxicité. Plusieurs plantes sont gravement affectées par les concentrations élevées de métaux toxiques, mais d'autres sont capables de faire face à la contamination par les métaux lourds en limitant leurs effets. Dans cette étude, les sites contaminés avec des métaux ont une quantité moyenne totale de Ni de 1600 mg/kg ce qui représente environ 11X la quantité biodisponible de Ni (Kalubi et *al.*, 2016). Cependant, la quantité à prendre en considération dans l'évaluation de la toxicité d'un milieu est

la quantité biodisponible parce que celle-ci est directement assimilable par les plantes. De ce fait, la quantité totale de métaux dans le sol est un mauvais indicateur de la toxicité.

Les transporteurs de métaux sont considérés comme l'un des principaux moteurs de la résistance des métaux chez les plantes. Seuls quelques transporteurs de métaux sont responsables du transport du nickel. La protéine AT2G16800 fait partie de la famille des protéines NiCoT. Les transporteurs de cette famille absorbent le nickel et / ou le cobalt en utilisant la force motrice des protons (Rodionov et *al.*, 2006). Chez les procaryotes, le Ni / CoT s'est avéré utile pour la bioaccumulation et la biorestauration du nickel (Deng et *al.*, 2013). Les transporteurs NiCoT ont été bien caractérisés chez les procaryotes, mais les connaissances sur les plantes sont encore limitées. Dans la présente étude nous avons observé une expression de l'AT2G16800 au niveau des racines de *Q. rubra* mais une association avec la contamination par les métaux n'était pas établie.

La protéine NRAMP (protéine de macrophage associée à la résistance naturelle) représente une nouvelle famille de protéines apparentées et impliquées dans le transport d'ions métalliques divalents. Cette famille de gènes a été hautement conservée au cours de l'évolution et des homologues ont été trouvés dans un large éventail d'organismes vivants, y compris des bactéries, des levures, des insectes, des mammifères et aussi des végétaux supérieurs (Williams et *al.*, 2000). Les analyses de l'expression du gène Nramp chez *Arabidopsis* suggèrent que ce gène joue un rôle dans le transport des métaux constitutifs, principalement le fer et le cadmium. Mizuno et *al.*, (2005) ont élucidé le rôle des transporteurs de métaux Nramp dans le transport et l'homéostasie du Ni^{2+} . Ils ont trouvé que l'expression de TjNramp4 induisait une élévation de la sensibilité au Ni^{2+} chez la levure. Thériault (2017) a associé l'expression du gène Nramp 3 avec

la résistance et l'accumulation de nickel. Dans la présente étude l'expression de ce gène a été observée mais, elle ne peut être associée à la contamination par les métaux.

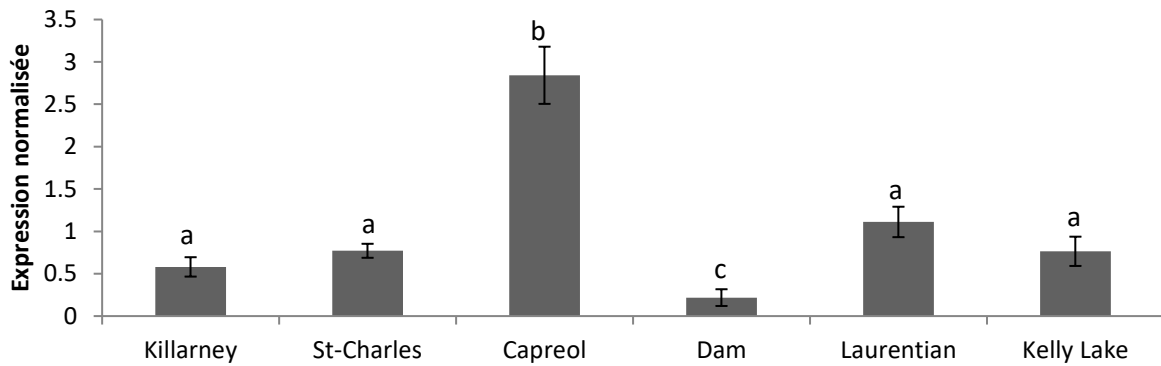
Les transporteurs ne sont pas les seuls gènes impliqués dans la résistance aux métaux. Les gènes issus des processus métaboliques sont souvent surexprimés en raison de leur capacité à séquestrer les ROS et à chélater les métaux (Freeman et *al.*, 2005 ; Mari et *al.*, 2006 ; Callahan et *al.*, 2008). L'augmentation de la biosynthèse du glutathion a été fortement associée avec la capacité à résister et à accumuler des niveaux élevés de nickel dans les racines (Freeman et *al.*, 2004 ; Freeman et *al.*, 2005). La production de glutathion dépend de plusieurs protéines telles que la gamma-EC synthase (gamma-ECS), la glutathion synthétase (GSH-S), la sérine acétyltransférase (SAT) et la glutathion réductase (GR) (Fabiano et *al.*, 2015). Certains de ces gènes ont été activés par le nickel, ce qui suggère que le glutathion joue un rôle important dans l'équilibre redox (Mustafiz et *al.*, 2014). Le glutathion doit être sous sa forme réduite afin de neutraliser les ROS et les métaux. Dans cette étude nous avons voulu déterminer si la glutathion réductase, l'enzyme clé qui réduit le glutathion, est régulée positivement par le nickel dans les racines de *Q. rubra*. Au vu de nos résultats, l'expression de GR ne peut être associée à la contamination par le Ni. Cette conclusion est également valable pour les gènes ACC désamine et SAT.

3.4. Conclusion

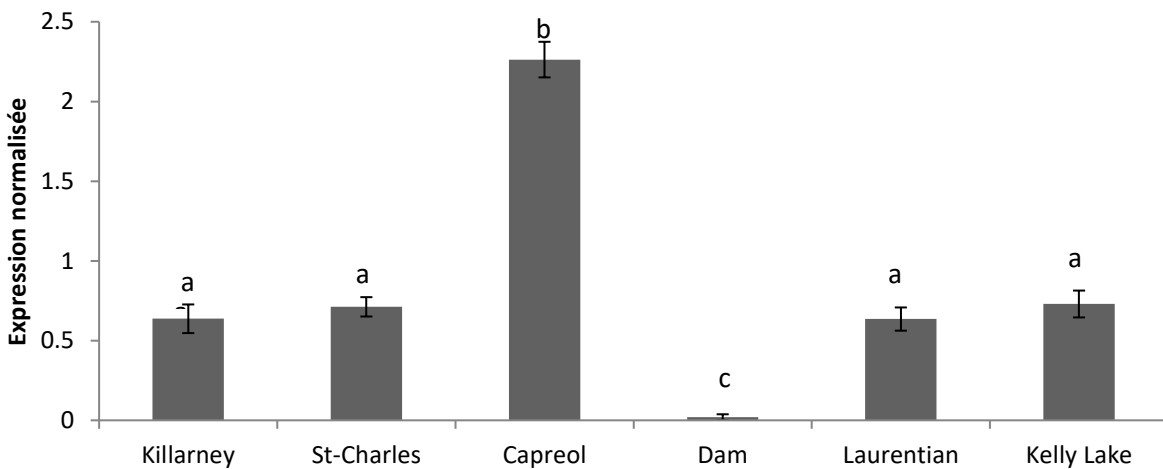
Dans la présente étude, nous avons vérifié si des gènes connus comme jouant un rôle dans la résistance au nickel chez d'autres espèces sont impliqués dans les réponses de *Q. rubra* à la contamination du sol par le nickel. Nous avons trouvé que pour tous les gènes étudiés, leur induction n'est pas associée avec la contamination par les métaux. Les résultats de cette étude

renforcent notre théorie selon laquelle les quantités biodisponibles de métaux que l'on trouve habituellement dans les sols fortement contaminés par des métaux dans le nord de l'Ontario ne peuvent déclencher une réaction génétique chez les espèces végétales supérieures.

a)



b)



c)

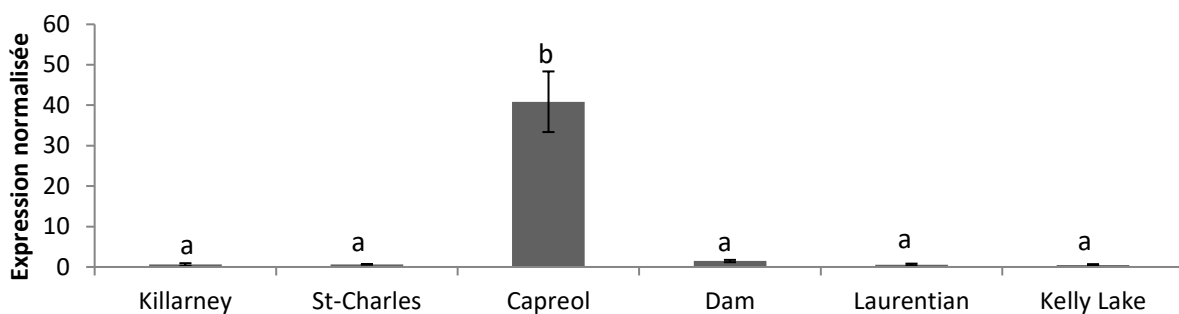
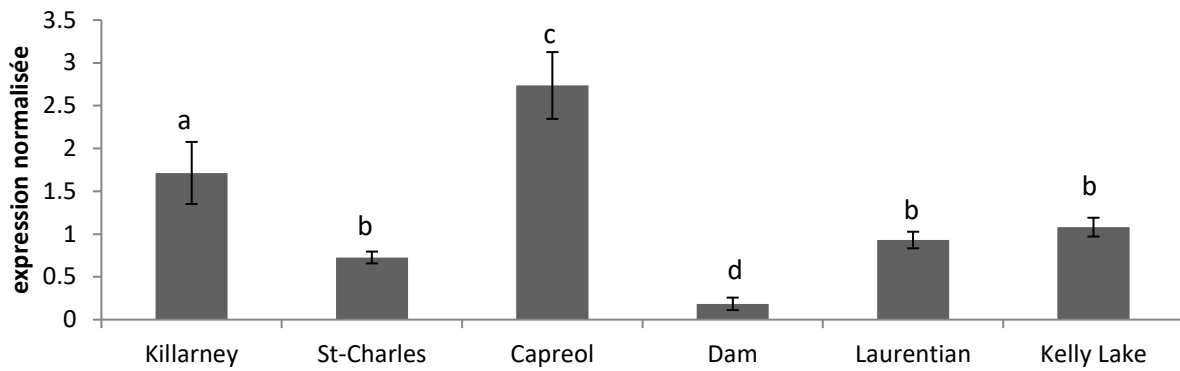
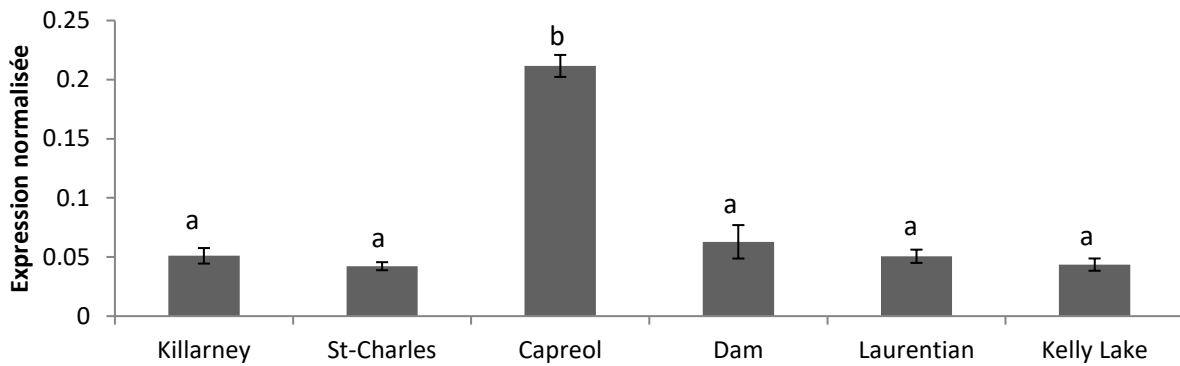


Figure 3.1 Expression de a) ACC désaminase, b) GR et c) SAT dans les racines des populations de *Q. rubra* provenant des zones de référence (Killarney, St-Charles et Capreol) et des zones contaminées (Wahnapitae Hydro Dam, Laurentian et Kelly Lake,) de la région du Grand Sudbury. L'expression de SAT a été normalisée par le gène de contrôle interne 18S ARNr, tandis que l'expression de GR et ACC désaminase a été normalisée par le gène EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey HSD ($P \geq 0.05$)

a)



b)



c)

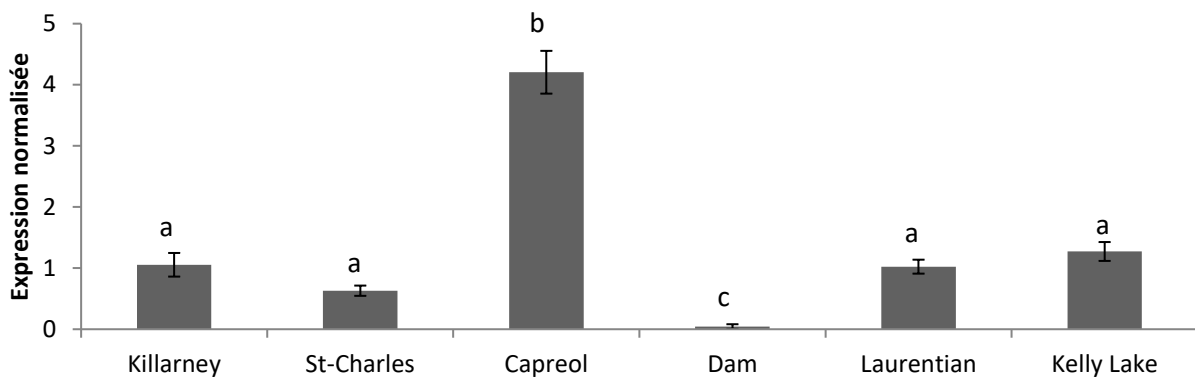


Figure 3.2 Expression de a) NAS3, b) NRAMP 3 et c) AT2G16800 dans les racines des populations de *Q. rubra* provenant des zones de référence (Killarney, St-Charles et Capreol) et des zones contaminées (Wahnapitae Hydro Dam, Laurentian et Kelly Lake,) de la région du Grand Sudbury. L'expression de ces gènes a été normalisée par le gène EF1 α . Les moyennes avec les indices communs ne sont pas significativement différentes d'après le test de comparaison multiple de Tukey HSD ($P \geq 0.05$)

CHAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE

La toxicité des métaux est une cause majeure de stress abiotique chez les plantes. Elles développent souvent des mécanismes de tolérance qui impliquent une adaptation biochimique et physiologique aux concentrations toxiques de métal dans les sols. Il a été établi que les changements dans l'expression des gènes se produisent très rapidement chez les plantes en réponse à des facteurs de stress environnementaux tels que l'augmentation des niveaux de métaux. *Q. rubra* est l'une des espèces pionnières qui a survécu sur les sites contaminés avec des taux élevés des métaux dans les régions minières du Nord de l'Ontario (Canada). Les principaux objectifs de cette étude étaient 1) de déterminer le niveau de toxicité du nickel chez le chêne rouge (*Quercus rubra*), 2) d'évaluer la régulation des gènes associés à la résistance au nickel chez les plantes de *Q. rubra* exposées à de différentes doses de nickel et 3) de déterminer l'expression des gènes impliqués dans la résistance au nickel chez les populations de *Q. rubra* provenant des sites contaminés avec des métaux et des sites de référence non contaminés de la région du Grand Sudbury.

Aucun signe physique de toxicité (nécrose, chlorose, flétrissement, diminution du taux de croissance) n'a été observé chez les plantes traitées avec différentes doses de nitrate de nickel. L'étude a démontré que les trois gènes ciblés (ACC désaminase, SAT et NAS3), réagissent différemment aux traitements. NAS3 présente une surexpression due au nickel dans les feuilles à la concentration de 1600 mg/kg mais aucune expression dans les racines. ACC désaminase et SAT sont beaucoup plus influencés par le nitrate. ACC désaminase a une expression plus élevée dans les feuilles et les concentrations de 150 mg/kg et 800 mg/kg induisent une surexpression de ce gène tandis qu'une répression est observée à la dose de 1600 mg/kg. Au niveau des racines, le nitrate induit une surexpression de l'ACC désaminase à la concentration de 800 mg/kg. Le gène

SAT est plus exprimé au niveau des racines et son induction par le nitrate nécessite une concentration minimale de 800 mg/kg. Il nécessite une quantité de 1600 mg/kg pour être induit par le nickel. Donc le nitrate et le nickel sont tous deux responsables de l'expression des gènes impliqués dans la résistance au nickel.

Ensuite, nous avons vérifié si des gènes connus comme jouant un rôle dans la résistance au nickel chez d'autres espèces sont impliqués dans les réponses de *Q. rubra* à la contamination du sol par des métaux. Nous avons trouvé que pour tous les gènes étudiés, il n'y a aucune association entre leur expression et la contamination par les métaux. Donc la quantité biodisponible de métaux trouvés dans les sites contaminés de la région du Grand Sudbury n'est pas assez suffisante pour provoquer l'expression des gènes impliqués à la résistance aux métaux et plus particulièrement au nickel. Toutefois des études supplémentaires sont nécessaires pour compléter cette étude.

Etudes futures

Pour mieux identifier les gènes impliqués dans la résistance au nickel et leur mécanisme chez *Q. rubra*, une analyse du transcriptome complet de cette espèce est nécessaire en utilisant les différentes doses testées. Elle nous permettrait d'identifier de nouveaux gènes associés à la résistance ou à la toxicité au nickel et de déterminer leurs mécanismes potentiels chez cette espèce.

REFERENCES

- Abedin, J., Beckett, P., & Spiers, G. (2012). An evaluation of extractants for assessment of metal phytoavailability to guide reclamation practices in acidic soils in northern regions. *Canadian Journal of Soil Science*, 92(1), 253-268.
- Abeles, F. B., Morgan, P. W., & Saltveit, M. E. (1992). Ethylene in plant biology. 2nd edn Academic Press. *New York*.
- Adamo, P., Dudka, S., Wilson, M. J., & McHardy, W. J. (2002). Distribution of trace elements in soils from the Sudbury smelting area (Ontario, Canada). *Water, Air, & Soil Pollution*, 137(1), 95-116.
- Aggarwal, N. I. D. H. I., Laura, J. S., & Sheoran, I. S. (1990). Effect of cadmium and nickel on germination, early seedling growth and photosynthesis of wheat and pigeonpea. *International journal of tropical agriculture*, 8(2), 141-147.
- Ahmad, M. S. A., Hussain, M., Saddiq, R., & Alvi, A. K. (2007). Mungbean: a nickel indicator, accumulator or excluder?. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 78(5), 319-324.
- Amiro, B. D., & Courtin, G. M. (1981). Patterns of vegetation in the vicinity of an industrially disturbed ecosystem, Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1623-1639.
- Aras, R. A., Small, A. J., Ando, T., & Blaser, M. J. (2002). Helicobacter pylori interstrain restriction-modification diversity prevents genome subversion by chromosomal DNA from competing strains. *Nucleic acids research*, 30(24), 5391-5397.
- Babu, M. M. (2004). Introduction to microarray data analysis. *Computational genomics: Theory and application*, 17(6), 225-49.
- Baker, A. J. M. (1981). Accumulators and excluders — strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, 3, 643-654.
- Baker, A. J. M., & Proctor, J. (1990). The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematics and Evolution*, 173(1-2), 91-108.
- Baker, A. J., & Walker, P. L. (1989). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *Heavy metal tolerance in plants. Evolutionary aspects*. CRC press, Boca Raton, FL, 155-176.
- Bauer, P., & Schuler, M. (2011). Heavy metals need assistance: the contribution of nicotianamine to metal circulation throughout the plant and the Arabidopsis NAS gene family. *Frontiers in plant science*, 2, 69.

- Becher, M., Talke, I. N., Krall, L., & Krämer, U. (2004). Cross-species microarray transcript profiling reveals high constitutive expression of metal homeostasis genes in shoots of the zinc hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *The Plant Journal*, 37(2), 251-268.
- Boominathan, R., & Doran, P. M. (2002). Ni-induced oxidative stress in roots of the Ni hyperaccumulator, *Alyssum bertolonii*. *New phytologist*, 156(2), 205-215.
- Braissant, O. L. I. V. I. E. R., & Wahli, W. (1998). A simplified in situ hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections. *Biochemica*, 1(1), 16.
- Brown, P. H., Welch, R. M., & Cary, E. E. (1987). Nickel: A micronutrient essential for higher plants. *Plant physiology*, 85(3), 801-803.
- Brunet, J. (2008). Adaptation aux métaux lourds d'une Fabacée (légumineuse): réponses phénologique et moléculaire au plomb du *Lathyrus sativus* L (Doctoral dissertation, Paris Est).
- Burns, R. M., & Honkala, B. H. (1990). *Silvics of North America* (Vol. 2, p. 727). Washington, DC: United States Department of Agriculture.
- Callahan, D. L., Roessner, U., Dumontet, V., Perrier, N., Wedd, A. G., Richard, A. J., Baker, A. J. M., and Koley, S. D. (2008) LC–MS and GC–MS metabolite profiling of nickel (II) complexes in the latex of the nickel-hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* and identification of methylated aldaric acid as a new nickel (II) ligand. *Phytochemistry*. 69, 240–251
- Carvalho, A., Paula, A., Guedes-Pinto, H., Martins, L., Carvalho, J., & Lima-Brito, J. (2009). Preliminary genetic approach based on both cytogenetic and molecular characterisations of nine oak species. *Plant Biosystems - an International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 143(sup1), S25-S33. doi:10.1080/11263500903192126
- Cataldo, D. A., Garland, T. R., & Wildung, R. E. (1978). Nickel in plants I. Uptake kinetics using intact soybean seedlings. *Plant Physiology*, 62(4), 563-565.
- Chang, S., Puryear, J., & Cairney, J. (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant molecular biology reporter*, 11(2), 113-116.
- Chen, C., Huang, D., & Liu, J. (2009). Functions and toxicity of nickel in plants: recent advances and future prospects. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 37(4-5), 304-313.
- Chen, L., Zhong, H. Y., Kuang, J. F., Li, J. G., Lu, W. J., & Chen, J. Y. (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, 234(2), 377.
- Cheng, S. (2003). “Effects of Heavy Metals on Plants and Resistance Mechanisms.” *Environmental Science and Pollution Research* 10(4):256–64.

- Conner, J. K., & Hartl, D. L. (2004). *A primer of ecological genetics*. Sinauer Associates Incorporated.
- Davison, A. W., & Reiling, K. (1995). A rapid change in ozone resistance of *Plantago major* after summers with high ozone concentrations. *New Phytologist*, 131(3), 337-344.
- Deng, X., He, J., & He, N. (2013). Comparative study on Ni²⁺-affinity transport of nickel/cobalt permeases (NiCoTs) and the potential of recombinant *Escherichia coli* for Ni²⁺ bioaccumulation. *Bioresource technology*, 130, 69-74.
- Derveaux, S., Vandesompele, J., & Hellemans, J. (2010). How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*, 50(4), 227-230.
- Dixon, N. E., Gazzola, C., Blakeley, R. L., & Zerner, B. (1975). Jack bean urease (EC 3.5. 1.5). Metalloenzyme. Simple biological role for nickel. *Journal of the American Chemical Society*, 97(14), 4131-4133.
- Dodd, R. S., & Kashani, N. (2003). Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section Lobatae). *Theoretical and Applied Genetics*, 107(5), 884-892.
- Douchkov, D., Gryczka, C., Stephan, U. W., Hell, R., & Bäumlein, H. (2005). Ectopic expression of nicotianamine synthase genes results in improved iron accumulation and increased nickel tolerance in transgenic tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 28(3), 365-374.
- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., & Xie, Y. (2015). Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, 2015.
- Ernst, W. H. (2006). Evolution of metal tolerance in higher plants. *Forest Snow Landscape Res*, 80(3), 251-274.
- Ewais, E. A. (1997). Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. *Biologia Plantarum*, 39(3), 403-410.
- Fabiano, C. C., Tezotto, T., Favarin, J. L., Polacco, J. C., & Mazzafera, P. (2015). Essentiality of nickel in plants: a role in plant stresses. *Frontiers in plant science*, 6.
- Fismes, J., Echevarria, G., Leclerc-Cessac, E., & Morel, J. L. (2005). Uptake and transport of radioactive nickel and cadmium into three vegetables after wet aerial contamination. *Journal of environmental quality*, 34(5), 1497-1507.
- Fowells, H. A. (1965). Silvics of forest trees of the United States. *Agric. Handb. US Dep. Agric.*, (271).

- Freedman, B., & Hutchinson, T. C. (1980). Pollutant inputs from the atmosphere and accumulations in soils and vegetation near a nickel–copper smelter at Sudbury, Ontario, Canada. *Canadian Journal of Botany*, 58(1), 108-132.
- Freeman, J. L., & Salt, D. E. (2007). The metal tolerance profile of *Thlaspi goesingense* is mimicked in *Arabidopsis thaliana* heterologously expressing serine acetyl-transferase. *BMC Plant Biology*, 7(1), 63.
- Freeman, J. L., Garcia, D., Kim, D., Hopf, A., & Salt, D. E. (2005). Constitutively elevated salicylic acid signals glutathione-mediated nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *Plant physiology*, 137(3), 1082-1091.
- Freeman, J. L., Persans, M. W., Nieman, K., Albrecht, C., Peer, W., Pickering, I. J., & Salt, D. E. (2004). Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators. *The Plant Cell Online*, 16(8), 2176-2191.
- Freeman, S., & Herron, J. C. (2004). *Evolutionary analysis* (No. Sirsi) i9780131018594). Upper Saddle River (NJ): Pearson Education.
- Gabbrielli, P., Pandolfini, T., Vergnano, O., & Palandri, M. R. (1990). Comparison of two serpentine species with different nickel tolerance strategies. *Plant and Soil*, 122(2), 271-277.
- Gajewska, E., & Skłodowska, M. (2007). Effect of nickel on ROS content and antioxidative enzyme activities in wheat leaves. *Biometals*, 20(1), 27-36.
- Gajewska, E., Skłodowska, M., Słaba, M., & Mazur, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities, proline and chlorophyll contents in wheat shoots. *Biologia Plantarum*, 50(4), 653-659.
- Glick, B. R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS microbiology letters*, 251(1), 1-7.
- Gomes-Junior, R. A., Moldes, C. A., Delite, F. S., Grato, P. L., Mazzafera, P., Lea, P. J., & Azevedo, R. A. (2006). Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5), 420-429.
- Goyal, S. S., and Huffaker, R. C. (1984) Nitrogen toxicity in plants. in Nitrogen in crop production, pp. 97–118, American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America
- Grant, S. Q. (2010). *Microsatellite genetic diversity of northern red oak (Quercus rubra L.) in western North Carolina pre-and post-chestnut blight and pre-and post-harvest*. Western Carolina University.

- Gratton, W. S., Nkongolo, K. K., & Spiers, G. A. (2000). Heavy metal accumulation in soil and jack pine (*Pinus banksiana*) needles in Sudbury, Ontario, Canada. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(4), 550-557.
- Grichko, V. P., & Glick, B. R. (2001). Flooding tolerance of transgenic tomato plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase controlled by the 35S, rolD or PRB-1b promoter. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(1), 19-25.
- Grichko, V. P., Filby, B., & Glick, B. R. (2000). Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *Journal of Biotechnology*, 81(1), 45-53.
- Guan, M. Y., Fan, S. K., Fang, X. Z., & Jin, C. W. (2015). Modification of nitrate uptake pathway in plants affects the cadmium uptake by roots. *Plant signaling & behavior*, 10(3), e990794.
- Guo, W. J., Meetam, M., & Goldsbrough, P. B. (2008). Examining the specific contributions of individual Arabidopsis metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. *Plant physiology*, 146(4), 1697-1706.
- Hall, J. L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, 53(366), 1-11.
- Hazlett, PW, GK Rutherford, and GWV Loon. 1983. Metal Contaminants in Surface Soils and Vegetation as a Result of Nickel/Copper Smelting at Coniston, Ontario, Canada. Kingston: Queen's University
- Heale, E. L., & Ormrod, D. P. (1982). Effects of nickel and copper on *Acer rubrum*, *Cornus stolonifera*, *Lonicera tatarica*, and *Pinus resinosa*. *Canadian Journal of Botany*, 60(12), 2674-2681.
- Heap, I. M. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pest Management Science*, 51(3), 235-243.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Honma, M., & Shimomura, T. (1978). Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(10), 1825-1831.
- Howarth, J. R., Domínguez-Solís, J. R., Gutiérrez-Alcalá, G., Wray, J. L., Romero, L. C., & Gotor, C. (2003). The serine acetyltransferase gene family in *Arabidopsis thaliana* and the regulation of its expression by cadmium. *Plant molecular biology*, 51(4), 589-598.

- Hutchinson, T. C., & Whitby, L. M. (1973). Study of airborne contamination of vegetation and soils by heavy metals from the Sudbury, Ontario, copper-nickel smelters. *Trace Subst. Environ. Health;(United States)*, 7(CONF-730613-).
- Hutchinson, T. C., & Whitby, L. M. (1977). The effects of acid rainfall and heavy metal particulates on a boreal forest ecosystem near the Sudbury smelting region of Canada. *Water, Air, & Soil Pollution*, 7(4), 421-438.
- Hyodo, H. (1991). Stress/wound ethylene. *The plant hormone ethylene*, 43-63.
- Jiang, J., & Gill, B. S. (1993). Sequential chromosome banding and in situ hybridization analysis. *Genome*, 36(4), 792-795.
- Kalubi, K. N., Mehes-Smith, M., & Omri, A. (2016). Comparative analysis of metal translocation in red maple (*Acer rubrum*) and trembling aspen (*Populus tremuloides*) populations from stressed ecosystems contaminated with metals. *Chemistry and Ecology*, 32(4), 312-323.
- Kawashima, C. G., Berkowitz, O., Hell, R., Noji, M., & Saito, K. (2005). Characterization and expression analysis of a serine acetyltransferase gene family involved in a key step of the sulfur assimilation pathway in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 137(1), 220-230.
- Keinänen, S. I., Hassinen, V. H., Kärenlampi, S. O., & Tervahauta, A. I. (2007). Isolation of genes up-regulated by copper in a copper-tolerant birch (*Betula pendula*) clone. *Tree physiology*, 27(9), 1243-1252.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M., Sennhauser, M., 2003. Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: comparison of different plant species in the field. *Plant Soil* 249, 67–81. doi:10.1023/A:1022590609042
- Kerkeb, L., & Krämer, U. (2003). The Role of Free Histidine in Xylem Loading of Nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. *Plant Physiology*, 131(2), 716-724.
- Kim, S., Takahashi, M., Higuchi, K., Tsunoda, K., Nakanishi, H., Yoshimura, E., ... & Nishizawa, N. K. (2005). Increased nicotianamine biosynthesis confers enhanced tolerance of high levels of metals, in particular nickel, to plants. *Plant and cell physiology*, 46(11), 1809-1818.
- Kirkby EA, Romheld V (2004) Micronutrients in plant physiology: Functions, uptake and mobility. Proceedings No. 543, International Fertiliser Society, York, UK. 1–51.
- Kirkey, F. M., Matthews, J., & Ryser, P. (2012). Metal resistance in populations of red maple (*Acer rubrum* L.) and white birch (*Betula papyrifera* Marsh.) from a metal-contaminated region and neighbouring non-contaminated regions. *Environmental pollution*, 164, 53-58.

- Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F., & Kishore, G. M. (1991). Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. *The Plant Cell*, 3(11), 1187-1193.
- Kobayashi, Y., Kuroda, K., Kimura, K., Southron-Francis, J. L., Furuzawa, A., Kimura, K., ... & Koyama, H. (2008). Amino acid polymorphisms in strictly conserved domains of a P-type ATPase HMA5 are involved in the mechanism of copper tolerance variation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 148(2), 969-980.
- Körner, L. E., Møller, L. M., & Jensen, P. (1987). Effects of Ca^{2+} and other divalent cations on uptake of Ni^{2+} by excised barley roots. *Physiologia Plantarum*, 71(1), 49-54.
- Kramer, E. M. (2005). Methods for studying the evolution of plant reproductive structures: comparative gene expression techniques. *Methods in enzymology*, 395, 617-636.
- Krämer, U., Cotter-Howells, J. D., Charnock, J. M., Baker, A. J., & Smith, J. A. C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. *Nature*, 379(6566), 635-638.
- Krämer, U., Pickering, I. J., Prince, R. C., Raskin, I., & Salt, D. E. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*, 122(4), 1343-1354.
- Krumlauf, R. (1994). Analysis of gene expression by northern blot. *Molecular biotechnology*, 2(3), 227-242.
- Krupa, Z., Siedlecka, A., Maksymiec, W., & Baszyński, T. (1993). In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. *Journal of Plant Physiology*, 142(6), 664-668.
- Kukkola, E., Rautio, P., & Huttunen, S. (2000). Stress indications in copper-and nickel-exposed Scots pine seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 43(3), 197-210.
- Kumar, P. N., Dushenkov, V., Motto, H., & Raskin, I. (1995). Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. *Environmental science & technology*, 29(5), 1232-1238.
- Küpper, H., Küpper, F., & Spiller, M. (1996). Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *Journal of Experimental Botany*, 47(2), 259-266.
- Küpper, H., Zhao, F. J., & McGrath, S. P. (1999). Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant physiology*, 119(1), 305-312.
- Law, W., & Salick, J. (2005). Human-induced dwarfing of Himalayan snow lotus, *Saussurea laniceps* (Asteraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(29), 10218-10220.

- Lee, J., Reeves, R. D., Brooks, R. R., & Jaffré, T. (1977). Isolation and identification of a citrato-complex of nickel from nickel-accumulating plants. *Phytochemistry*, 16(10), 1503-1505.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. Academic Press..
- Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J., & Kochian, L. V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *The Plant Journal*, 57(3), 389-399.
- Lyford, W., 1980. Development of the root system of northern Red Oak *Quercus-rubra*, Harvard Forest Papers. Harvard University, Petersham, Massachusetts.
- Makela, M. (2016). *Molecular analysis of northern red oak (Quercus rubra) populations from the Greater Sudbury Region: genetic variation and gene expression* (Master Thesis, Laurentian University of Sudbury).
- Mari, S., Gendreau, D., Pianelli, K., Ouerdane, L., Lobinski, R., Briat, J. F., Lebrun, M & Czernic, P. (2006). Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine–nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4111-4122.
- Marschner, H. (2011). *Marschner's mineral nutrition of higher plants*. Academic press.
- Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 166(2), 525-530.
- McFadden, G. I. (1995). In situ hybridization. *Methods in cell biology*, 49, 165-183.
- McIlveen, W. D., & Negusanti, J. J. (1994). Nickel in the terrestrial environment. *Science of the total environment*, 148(2-3), 109-138.
- Mehes-Smith, M., & Nkongolo, K. K. (2015). Physiological and cytological responses of *Deschampsia cespitosa* and *Populus tremuloides* to soil metal contamination. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(4), 125.
- Mehes-Smith, M., Nkongolo, K. K., Narendrula, R., & Cholewa, E. (2013). Mobility of heavy metals in plants and soil: a case study from a mining region in Canada. *Am J Environ Sci*, 9(6), 483-493.
- Mehes-Smith, M., Nkongolo, K., & Cholewa, E. (2013). Coping mechanisms of plants to metal contaminated soil. In *Environmental change and sustainability*. InTech.

- Merlot, S., Hannibal, L., Martins, S., Martinelli, L., Amir, H., Lebrun, M., & Thomine, S. (2014). The metal transporter PgIREG1 from the hyperaccumulator *Psychotria gabriellae* is a candidate gene for nickel tolerance and accumulation. *Journal of experimental botany*, 65(6), 1551-1564.
- Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome biology*, 10(6), R64.
- Mganga, N., Manoko, M. L. K., & Rulangeranga, Z. K. (2011). Classification of plants according to their heavy metal content around north mara gold mine, Tanzania: Implication for phytoremediation. *Tanzania Journal of Science*, 37, 109-119.
- Mizuno, T., Usui, K., Horie, K., Nosaka, S., Mizuno, N., & Obata, H. (2005). Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from a Ni hyperaccumulator plant *Thlaspi japonicum* and their Ni 2+-transport abilities. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(8), 793-801.
- Mustafiz, A., Ghosh, A., Tripathi, A. K., Kaur, C., Ganguly, A. K., Bhavesh, N. S., ... & Singla-Pareek, S. L. (2014). A unique Ni²⁺-dependent and methylglyoxal-inducible rice glyoxalase I possesses a single active site and functions in abiotic stress response. *The Plant Journal*, 78(6), 951-963.
- Narendrula, R., Nkongolo, K. K., & Beckett, P. (2012). Comparative soil metal analyses in sudbury (Ontario, Canada) and lubumbashi (Katanga, DR-Congo). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 88(2), 187-192.
- Nexom, G.(2003). "Northern Red Oak – *Quercus Rubra* L." date de consultation 10 Août 2017 (https://plants.usda.gov/plantguide/pdf/cs_quru.pdf).
- Nie, L., Shah, S., Rashid, A., Burd, G. I., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2002). Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(4), 355-361.
- Nieminen, T. M., Ukonmaanaho, L., Rausch, N., & Shotyk, W. (2007). Biogeochemistry of nickel and its release into the environment. *Metal ions in life sciences*, 2, 1-30.
- Nixon, K. C. (1993). Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. In *Annales des sciences forestières* (Vol. 50, No. Supplement, pp. 25s-34s). EDP Sciences.
- Nkongolo, K. K., Spiers, G., Beckett, P., Narendrula, R., Theriault, G., Tran, A., & Kalubi, K. N. (2013). Long-term effects of liming on soil chemistry in stable and eroded upland areas in a mining region. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(7), 1618.

- Nkongolo, K. K., Vaillancourt, A., Dobrzeniecka, S., Mehes, M., & Beckett, P. (2008). Metal content in soil and black spruce (*Picea mariana*) trees in the Sudbury region (Ontario, Canada): low concentration of arsenic, cadmium, and nickel detected near smelter sources. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 80(2), 107.
- Nordal, I., Haraldsen, K. B., Ergon, Å., & Eriksen, A. B. (1999). Copper resistance and genetic diversity in *Lychnis alpina* (Caryophyllaceae) populations on mining sites. *Folia Geobotanica*, 34(4), 471-481.
- Page, V., Weisskopf, L., & Feller, U. (2006). Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytologist*, 171(2), 329-341.
- Pandey, N., & Sharma, C. P. (2002). Effect of heavy metals Co²⁺, Ni²⁺ and Cd²⁺ on growth and metabolism of cabbage. *Plant Science*, 163(4), 753-758.
- Parida, B. K., Chhibba, I. M., & Nayyar, V. K. (2003). Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. *Scientia horticulturae*, 98(2), 113-119.
- Parker, M. B., Gascho, G. J., & Gaines, T. P. (1983). Chloride toxicity of soybeans grown on Atlantic coast flatwoods soils. *Agronomy Journal*, 75(3), 439-443.
- Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Tiemann, K. J., Parsons, J. G., & Carrillo, G. (2002). Effect of mixed cadmium, copper, nickel and zinc at different pHs upon alfalfa growth and heavy metal uptake. *Environmental Pollution*, 119(3), 291-301.
- Price-Haughey, J., Bonham, K., & Gedamu, L. (1986). Heavy metal-induced gene expression in fish and fish cell lines. *Environmental health perspectives*, 65, 141.
- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 393-404.
- Rahman, H., Sabreen, S., Alam, S., & Kawai, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *Journal of Plant Nutrition*, 28(3), 393-404.
- Rao, K. M., & Sresty, T. V. S. (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. *Plant science*, 157(1), 113-128.
- Reeves, R. D., Baker, A. J. M., Bgrhidi, A., & Berazain, R. (1996). Nickel-accumulating plants from the ancient serpentine soils of Cuba. *New Phytologist*, 133(2), 217-224.
- Reis-Filho, J. S. (2009). Next-generation sequencing. *Breast Cancer Research*, 11(3), S12.

- Rodionov, D. A., Hebbeln, P., Gelfand, M. S., & Eitinger, T. (2006). Comparative and functional genomic analysis of prokaryotic nickel and cobalt uptake transporters: evidence for a novel group of ATP-binding cassette transporters. *Journal of bacteriology*, 188(1), 317-327.
- Russo, G., Zegar, C., & Giordano, A. (2003). Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*, 22(42), 6497-6507.
- Ryan, P. R., Raman, H., Gupta, S., Horst, W. J., & Delhaize, E. (2009). A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiology*, 149(1), 340-351.
- Safford, L.O., Bjorkhom, J.C., Zasada, J.C., 1990. *Betula papyrifera* Marsh. Paper Birch, in: Burns, R.M., Henkala, B.H. (Eds.), *Silvics of North America: 2 Hardwoods*, Agriculture Handbook 654. U.S. Department of Agriculture, Forest Services, Washington, D.C., USA, pp. 158–171.
- Salt, D. E., Smith, R. D., & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 49(1), 643-668.
- Schaaf, G., Honsbein, A., Meda, A. R., Kirchner, S., Wipf, D., & von Wirén, N. (2006). AtIREG2 encodes a tonoplast transport protein involved in iron-dependent nickel detoxification in *Arabidopsis thaliana* roots. *Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25532-25540.
- SCHNITZLER, J. P., Steinbrecher, R., Zimmer, I., Steigner, D., & Fladung, M. (2004). Hybridization of European oaks (*Quercus ilex* × *Q. robur*) results in a mixed isoprenoid emitter type. *Plant, Cell & Environment*, 27(5), 585-593.
- Seregin, I. V., & Kozhevnikova, A. D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 53(2), 257-277.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2009). The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends in plant science*, 14(1), 43-50.
- Sheoran, I. S., Singal, H. R., & Singh, R. (1990). Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and the enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Photosynthesis Research*, 23(3), 345-351.
- Shojima, S., Nishizawa, N. K., Fushiya, S., Nozoe, S., Irifune, T., & Mori, S. (1990). Biosynthesis of phytosiderophores. *Plant Physiology*, 93(4), 1497-1503.
- Singh, R. P., Shelke, G. M., Kumar, A., & Jha, P. N. (2015). Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants. *Frontiers in microbiology*, 6.
- Smith, M. 2008. “The Reclamation of Sudbury: The Greening of a Moonscape.” Viewpoint: Perspectives on Modern Mining, a publication of Caterpillar Global Mining 2(4):1–11

- Southern, E., Mir, K., & Shchepinov, M. (1999). Molecular interactions on microarrays. *Nature genetics*, 21, 5-9.
- Stearns, J. C., Shah, S., Greenberg, B. M., Dixon, D. G., & Glick, B. R. (2005). Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(7), 701-708.
- Taylor, G. J. (1987). Exclusion of metals from the symplasm: a possible mechanism of metal tolerance in higher plants. *Journal of Plant Nutrition*, 10(9-16), 1213-1222.
- Theriault, G. (2017). *Molecular analysis of Betula papyrifera populations from a mining reclaimed region: genetic and transcriptome characterization of metal resistant and susceptible genotypes* (Doctoral dissertation, Laurentian University of Sudbury).
- Theriault, G., & Nkongolo, K. (2016). Nickel and copper toxicity and plant response mechanisms in white birch (*Betula papyrifera*). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 97(2), 171-176.
- Theriault, G., Michael, P., & Nkongolo, K. (2016). Comprehensive transcriptome analysis of response to nickel stress in white birch (*Betula papyrifera*). *PloS one*, 11(4), e0153762.
- Theriault, G., Nkongolo, K. K., & Michael, P. (2014). Genetic and metal analyses of fragmented populations of *Betula papyrifera* (Marsh) in a mining reclaimed region: identification of population–diagnostic molecular marker. *Ecology and evolution*, 4(17), 3435-3443.
- Tong, Y. P., Kneer, R., & Zhu, Y. G. (2004). Vacuolar compartmentalization: a second-generation approach to engineering plants for phytoremediation. *Trends in plant science*, 9(1), 7-9.
- Tran, A., Nkongolo, K. K., Mehes-Smith, M., Narendrula, R., Spiers, G., & Beckett, P. (2014). Heavy metal analysis in red oak (*Quercus rubra*) populations from a mining region in northern Ontario (Canada): effect of soil liming and analysis of genetic variation. *American Journal of Environmental Sciences*, 10(4), 363.
- Vacchina, V., Mari, S., Czernic, P., Marquès, L., Pianelli, K., Schaumlöffel, D., ... & Łobiński, R. (2003). Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography– inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation. *Analytical Chemistry*, 75(11), 2740-2745.
- van de Mortel, J. E., Villanueva, L. A., Schat, H., Kwekkeboom, J., Coughlan, S., Moerland, P. D., & Aarts, M. G. (2006). Large expression differences in genes for iron and zinc homeostasis, stress response, and lignin biosynthesis distinguish roots of *Arabidopsis thaliana* and the related metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiology*, 142(3), 1127-1147.

- Vandeligt, K. K., Nkongolo, K. K., Mehes, M., & Beckett, P. (2011). Genetic analysis of *Pinus banksiana* and *Pinus resinosa* populations from stressed sites contaminated with metals in Northern Ontario (Canada). *Chemistry and Ecology*, 27(4), 369-380.
- Vekemans, X., Lefebvre, C., Coulaud, J., Blaise, S., Gruber, W., Siljak-Yakovlev, S., & Brown, S. C. (1996). Variation in nuclear DNA content at the species level in *Armeria maritima*. *Hereditas*, 124(3), 237-242.
- VETAC. 2015. "Regreening Program, Annual Report 2015." 1–32.
- Viehweger, K. (2014). How plants cope with heavy metals. *Botanical Studies*, 55(1), 35.
- Violante, A., Cozzolino, V., Perelomov, L., Caporale, A. G., & Pigna, M. (2010). Mobility and bioavailability of heavy metals and metalloids in soil environments. *Journal of soil science and plant nutrition*, 10(3), 268-292.
- Visioli, G., Gulli, M., & Marmioli, N. (2014). *Noccaea caerulescens* populations adapted to grow in metalliferous and non-metalliferous soils: Ni tolerance, accumulation and expression analysis of genes involved in metal homeostasis. *Environmental and experimental botany*, 105, 10-17.
- WANG, F. F., WANG, P. C., DONG, R. B., YANG, Z. N., & CUI, Y. L. (2007). Subcellular localization of a nickel ion transport protein in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Shanghai Normal University (Natural Sciences)*, 2, 015.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Ward, J. K., Antonovics, J., Thomas, R. B., & Strain, B. R. (2000). Is atmospheric CO₂ a selective agent on model C₃ annuals?. *Oecologia*, 123(3), 330-341.
- Weber, M., Harada, E., Vess, C., Roepenack-Lahaye, E. V., & Clemens, S. (2004). Comparative microarray analysis of *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis halleri* roots identifies nicotianamine synthase, a ZIP transporter and other genes as potential metal hyperaccumulation factors. *The Plant Journal*, 37(2), 269-281.
- Wei, S., Zhou, Q., & Wang, X. (2005). Identification of weed plants excluding the uptake of heavy metals. *Environment International*, 31(6), 829-834.
- Williams, L. E., Pittman, J. K., & Hall, J. L. (2000). Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 104-126.
- Winterhalder, K. (1995). Early history of human activities in the Sudbury area and ecological damage to the landscape. In *Restoration and recovery of an industrial region* (pp. 17-31). Springer, New York, NY.

- Winterhalder, K. (1996). Environmental degradation and rehabilitation of the landscape around Sudbury, a major mining and smelting area. *Environmental Reviews*, 4(3), 185-224.
- Wren, C. (2012). *Risk assessment and environmental management: A case study in Sudbury, Ontario, Canada*. Maraltes.
- Wright DA, Welbourn P (2002) Environmental Toxicology. Cambridge University Press.
- Yadav, S. K. (2010). Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. *South African Journal of Botany*, 76(2), 167-179.
- Zenk, M.H. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants. *Gene* 179: 21–30.
- Zhao, J., Shi, G., & Yuan, Q. (2008). Polyamines content and physiological and biochemical responses to ladder concentration of nickel stress in *Hydrocharis dubia* (Bl.) Backer leaves. *Biometals*, 21(6), 665.

ANNEXES

**ANNEXE 1 : GUIDE DE LA CONCENTRATION DES MÉTAUX DANS LE SOL SELON
LE MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'ACTION EN MATIÈRE DE
CHANGEMENT CLIMATIQUE DE L'ONTARIO**

Métaux	Guides de la qualité des sédiments en Ontario (mg/kg)	
	Niveau à effet mineure	Niveau à effet sévère
Arsenic	6	33
Cadmium	0.6	10
Cobalt		50
Cuivre	16	110
Fer	2%	4%
Plomb	31	250
Manganèse	460	1100
Nickel	16	75
Zinc	120	820

ANNEXE 2 : ARBRE, FEUILLE ET GLAND DU CHENE ROUGE D'AMÉRIQUE
(Q.rubra)

